

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE QUÍMICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA, NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN Y ANÁLISIS ALIMENTARIO (IIAA)



GRADO EN QUÍMICA

**DESARROLLO DE MÉTODOS
MULTIANALITO PARA LA DETERMINACIÓN
DE RESIDUOS DE FITOSANITARIOS EN
VINO MEDIANTE LC-MS/MS**

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Curso 2016/2017

Andrea Blanco Codeso
Santiago de Compostela, Julio 2017



**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA,
NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA.**

Facultad de Química

15782 Santiago de Compostela

Telf. 981 591 079 · Fax. 981 547 141

Correo electrónico : qnsec@usc.es

Isaac Rodríguez Pereiro, Profesor Titular de Universidad del Área de Química Analítica, y **Rafael Cela Torrijos**, Catedrático, de la misma Área de conocimiento de la Universidad de Santiago de Compostela,

Autorizan:

A la alumna **Andrea Blanco Codeso** a la presentación del estudio **“Desarrollo de métodos multianalítico para la determinación de residuos de fitosanitarios en vino mediante LC-MS/MS”**, que ha realizado bajo su dirección en el Laboratorio de Química Analítica del Instituto de Investigación y Análisis Alimentario (IIAA), de la Universidad de Santiago de Compostela, como *Trabajo de Fin de Grado* en Química,

Para que conste, firmamos la presente autorización en Santiago de Compostela a 13 de Julio de 2017.

Isaac Rodríguez Pereiro

Rafael Cela Torrijos

ÍNDICE

ABSTRACT/RESUMEN/ RESUMO	1
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.....	3
1. FITOSANITARIOS.....	3
1.1. Tipos de fitosanitarios empleados en viticultura.....	3
1.2. Estructura, propiedades físico-químicas y clasificación.....	6
1.3. Toxicidad de los pesticidas.....	9
1.4. Legislación.....	10
2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA APLICADOS A MUESTRAS DE VINO.....	11
2.1. Extracción líquido-líquido (LLE).....	11
2.2. Extracción en fase sólida (SPE).....	11
2.3. Técnicas de microextracción.....	12
2.3.1. <i>Microextracción en fase sólida (SPME)</i>	12
2.3.2. <i>Microextracción en fase líquida (LPME)</i>	13
2.4. QuEChERS.....	13
3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS.....	14
3.1. Métodos de GC-MS (MS/MS).....	14
3.2. Métodos de LC-MS (MS/MS).....	15
3.3. Espectrometría de masas.....	15
4. RESUMEN BIBLIOGRÁFICO DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN VINO.....	16
5. DISTRIBUCIÓN DE PESTICIDAS EN VINOS COMERCIALES.....	19
CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN.....	22

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL.....	23
1. MATERIAL Y REACTIVOS.....	23
1.1. Material.....	23
1.2. Reactivos y disolventes.....	23
1.3. Patrones.....	23
1.4. Patrones internos.....	24
1.5. Gases.....	25
2. INSTRUMENTACIÓN.....	25
3. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES.....	25
4. LAVADO DEL MATERIAL.....	26
5. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE SPE.....	26
6. CONDICIONES DE DETERMINACIÓN MEDIANTE UPLC-MS/MS.....	28
 CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	 29
1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS.....	29
2. CARACTERIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE	
DETERMINACIÓN (UPLC-ESI-MS/MS).....	30
3. ESTUDIO DEL MÉTODO SPE.....	33
4. CARACTERIZACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN.....	39
5. APLICACIÓN A MUESTRAS DE VINOS COMERCIALES.....	42
 CAPÍTULO V. CONCLUSIONES/CONCLUSIÓN/CONCLUSIONS.....	 48
 VI. BIBLIOGRAFÍA.....	 51

• RESUMEN

Los pesticidas son compuestos que se emplean en viñedos de todo el mundo para garantizar una protección en la cosecha con escasas pérdidas, producidas por diferentes organismos, en uvas empleadas para la elaboración del vino. El modo de acción de estos compuestos se basa en la interferencia sobre el metabolismo de diferentes organismos sin afectar a la vida. Un incremento en el empleo de estos compuestos puede determinar la existencia de residuos en las uvas en el momento de la cosecha, desde donde pueden alcanzar el vino que se elabora con las mismas. Por ese motivo, se ha establecido una legislación que regule la cantidad máxima de residuos de pesticidas en uvas, y aunque a día de hoy no hay valores regulados en el vino, se recomienda que no excedan al 10% de los límites en uvas. En este estudio se ha trabajado con distintos tipos de fitosanitarios, fungicidas principalmente aunque también algún insecticida, con el objetivo de poder detectar la mayor cantidad de estas sustancias en vinos comerciales optimizando la extracción mediante extracción en fase sólida (SPE) y detección mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-ESI-MS/MS). Se presenta una metodología analítica sencilla, rápida y robusta que puede ser implementada en laboratorios de control de alimentos.

• RESUMO

Os pesticidas son compostos empregados en viñas arredor do mundo para garantir unha protección na colleita con poucas perdas, producidas por distintos organismos, en uvas utilizadas para a fabricación do viño. O modo de acción destes compostos baséase na intromisión sobre o metabolismo de diferentes organismos sen afectar á vida. Un acrecentamento no uso destes compostos pode fixar a existencia de residuos nas uvas no momento da colleita onde poden chegar ao viño que se produce coas mesmas. Por ese motivo, estipulouse unha lexislación que regula a cantidade máxima de residuos de pesticidas en uvas, e, aínda que a día de hoxe non hay valores regulamentados no viño, recoméndase que non superen ao 10 % dos límites en uvas. Neste estudo traballouse con diferentes tipos de pesticidas, fungicidas principalmente aínda que tamén algún insecticida, co obxecto de poder detectar a maior cantidade destas sustancias en viños comerciais optimizando a extracción por medio da extracción en fase sólida (SPE) e detección por medio de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). Preséntase unha metodoloxía analítica simple, rápida e robusta que pode ser aplicada en laboratorios de control de alimentos.

• ABSTRACT

Pesticides are compounds that are used in vineyards around the world to ensure protection at harvest with a few loss, produced by different organisms, in grapes used to make wine. The mode of action of these compounds is based on the interference on the metabolism of different organisms without affecting the vine. An increase in the use of these compounds can determine the existence of residues in grapes at the time of harvest, from where they can reach the wine that is elaborated with the same ones. For this reason, legislation has been established to regulate the maximum amount of pesticide residues in grapes, and although there are currently no regulated values in wine, it is recommended that they do not exceed 10% of the limits on grapes. In this study we have worked with different types of pesticides, mainly fungicides but also some insecticide, with the purpose of being able to detect the greatest amount of these substances in commercial wines, extraction has been optimized by solid phase extraction (SPE) and detection has been optimized by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-ESI-MS/MS). It is presented a simple, fast and robust analytical methodology that can be implemented in food control laboratories.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN.

1. FITOSANITARIOS.

1.1. Tipos de fitosanitarios empleados en viticultura.

De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, los fitosanitarios se definen como una o varias sustancias activas u otros ingredientes, conformando una mezcla con el fin de proteger los productos de origen vegetal de organismos nocivos, tanto de tipo vegetal como animal, que conforman plagas. Dentro de estos fitosanitarios, también se encuentran las sustancias que destruyen, regulan o inhiben la germinación de las plantas, pero no se contemplan dentro de este grupo vacunas, medicamentos y antibióticos para uso humano o veterinario o agentes utilizados en el control biológico. Los productos fitosanitarios ayudan a asegurar una buena calidad en los alimentos, así como contribuyen al aumento de los rendimientos en la agricultura [1].

Según la OMS (Organización Mundial de la Salud), los fitosanitarios se pueden clasificar atendiendo a los organismos a los que estén destinados, siendo estos; insectos (insecticidas), ácaros (acaricidas), moluscos (molusquicidas), roedores (rodenticidas o raticidas), hongos (fungicidas), gusanos y larvas (nematicidas), malas hierbas (herbicidas), bacterias (antibióticos, pero sin comprender los de uso humano, y bactericidas) y otras formas de vida perjudiciales para la salud pública y también para la agricultura, consideradas como plagas animales o vegetales que puedan ser generadas durante la producción, almacenamiento, transporte, distribución y elaboración de productos agrícolas y sus derivados. Actualmente no se puede pensar en un cultivo racional sin el uso de algún tipo de pesticida, ya que la pérdida de cosechas en todo el mundo debido a causa de insectos, enfermedades de las plantas y malas hierbas es equivalente a un tercio de la producción total [2], [3].

Para el estudio de los productos de fitosanitarios en vino, nos centraremos solamente en los tres tipos más importantes en éste área: herbicidas, insecticidas y, sobre todo, fungicidas.

Los herbicidas son sustancias destinadas a destruir las malas hierbas, cuyo método de acción es la interferencia en los procesos bioquímicos, como la fotosíntesis, que tienen lugar en el sistema vivo de éstas. Generalmente se aplican en solución, o suspensión acuosa, en forma de nube de pequeñas gotas dirigidas hacia el objetivo de la aplicación. Los herbicidas ofrecen los medios más efectivos para el control de las plagas siendo, en los países industrializados, aplicados sobre el 85-100% de todos los cultivos principales. Este tipo de sustancias son propensas a la descomposición por microbios, plantas y animales y no son comunes los problemas de residuos de herbicidas si se utilizan de acuerdo a las instrucciones de las etiquetas [4]. A pesar de todos los beneficios que nos aportan, un mal uso de estos puede convertirse en un serio problema ya que, toda sustancia química usada en

agricultura puede provocar un efecto negativo en el ambiente si es utilizada en altas dosis. El uso prolongado de un mismo herbicida puede causar problemas de resistencia de malezas, fenómeno que consiste en la aparición de biotipos tolerantes de una especie, la cual anteriormente era controlada por el herbicida [5].

Por otro lado, los insecticidas son fitosanitarios destinados a controlar el ataque de insectos y para eso, existen distintos caminos a través de los que pueden actuar, siendo; envenenamiento por contacto, en dónde el insecticida penetra a través de la cutícula del insecto hasta alcanzar el sitio activo; envenenamiento oral, en dónde el insecticida es ingerido y absorbido a través del intestino; o también por fumigaciones, en dónde el insecticida penetra en el cuerpo del insecto a través de los espiráculos del sistema respiratorio. Pero, al igual que pasa con los herbicidas, los insectos también desarrollan resistencia a los insecticidas debido al contacto continuo con estos. Esta resistencia puede ser expresada por varios caminos; que el insecto no entre en contacto con la deposición del insecticida, que se modifique la composición del exoesqueleto inhibiendo así la penetración del insecticida; la modificación del sitio activo para el fitosanitario reduciendo la sensibilidad a la forma activa del insecticida; o que la vía metabólica del insecto se modifique, negando el metabolismo del compuesto aplicado en su forma tóxica [6]. Aunque, por lo general, otros aspectos de la agricultura moderna tienen un mayor impacto en el medio ambiente, los insecticidas se encuentran entre las herramientas agrícolas que están más asociadas con el daño ambiental. Su objetivo específico es matar a plagas de insectos por lo que puede que tenga un impacto letal en organismos que no son su objetivo [7].

Por último, los fungicidas están destinados tanto a combatir las plagas de hongos como a combatir las enfermedades fungosas de las plantas, ya sea matando, retrasando el desarrollo o inhibiendo la reproducción de los hongos. Los fungicidas, en general, se dividen atendiendo al modo de acción de éstos en fungicidas de contacto, fungicidas penetrantes o fungicidas sistemáticos.

Los fungicidas de contacto protegen únicamente el sitio de aplicación contra las plagas quedando en el exterior de la planta, de ésta manera, sin penetrar en el tejido vegetal, forman una película protectora. Cuando alguna espora de un hongo llega a su superficie, se encuentra con esa película que le impide penetrar o, en su defecto, germinar. En el caso de que atraviesen el tejido vegetal, bien sea por una alta dosis o por una rotura en las paredes de la planta, se convierten en un producto tóxico para ella llegando a quemarla.

Otro tipo de fungicidas, los fungicidas penetrantes, como su nombre indica, se introducen en el tejido vegetal y una vez dentro cuentan con muy poca movilidad, es decir, no circulan por los vasos conductores. Al tener la capacidad de entrar en la planta pueden combatir a los hongos que ya se encuentren dentro de ésta, pero no pueden ser tóxicos para ella porque de lo contrario la dañarían.

Por último, nos encontramos con los fungicidas sistemáticos. Este tipo de fungicidas actúan protegiendo a la planta contra las plagas en distintas zonas por transfusión del fitosanitario dentro de la misma. Esto sucede porque penetran en el tejido vegetal y circulan por ella a través de la corriente de los vasos conductores.

El método de acción de los fungicidas se basa en interferir en el metabolismo de los hongos, ya sea por un

ataque en la producción de energía, la inhibición de la mitosis o inhibiendo la formación de quitina, que se trata del compuesto principal de la pared celular de los hongos y que, por ende, influye en la permeabilidad de la membrana [8], [9].

Las enfermedades fúngicas fundamentales que nos podemos encontrar en las uvas de la vid son la botritis, el oídio y el mildium, las cuales pueden llegar a causar pérdidas importantes en viticultura.

La enfermedad de la botritis, también llamada moho gris, está causada por el hongo *Botrytis cinerea* y se puede encontrar en todo el mundo infectando a un amplio número de plantas. Se trata de uno de los patógenos fúngicos más interesantes debido a que puede vivir tanto de forma patológica, produciendo la enfermedad, como alimentándose de materia orgánica en descomposición. La acción fúngica del hongo se lleva a cabo cuando las uvas empiezan a acumular azúcar, pudiendo ser muy devastador en algunas condiciones, sobre todo en cultivos empapados por la lluvia o localizados en un ambiente húmedo y con viento, produciendo la pérdida de los racimos de uvas que son infectados. O, por el contrario, en otro tipo de condiciones ambientales de sequedad, después de unas condiciones de humedad, dicho hongo le confiere beneficios a ciertos tipos de vino blanco [10].



Figura I.1. Enfermedad de botritis en un racimo de uvas [11].

El oídio es una enfermedad causada por la especie *Uncinula necator*, la cual afecta tanto al rendimiento como a la calidad de las uvas y altera las cualidades de sus derivados; vino, mosto, etc. El proceso de infección del oídio tiene lugar siguiendo un ciclo de reproducción en las distintas estaciones del año. El riesgo de infección viene dado en función de la temperatura, óptima entre 25-30°C, humedad del ambiente en el que se encuentre, y también en función de la temporada, siendo más resistentes los racimos de uvas a medida que van madurando. El hongo afecta a todas las partes de la vid: hojas, tallo y racimos, las cuales, presentan síntomas distintos. Las hojas se vuelven de un color amarillento y se cubren de un polvo fino blanco grisáceo. En el tallo, el oídio se manifiesta a través de manchas difuminadas con coloración inicial verde oscuro, volviéndose cada vez más oscuras al final y si ocurre un ataque fuerte, puede desembocar en que el tallo se acabe secando y por consiguiente disminuye la producción. Pero el ataque más fuerte se produce en los racimos, empezando por cubrirse del polvillo blanco grisáceo, y continuando con que el oídio detiene el crecimiento de la piel de la uva con la consecuencia que la uva se agrieta. Esta enfermedad produce unos daños directos en la cantidad y calidad de la cosecha y si no se toman medidas de prevención, las pérdidas pueden llegar a ser totales [12], [13].

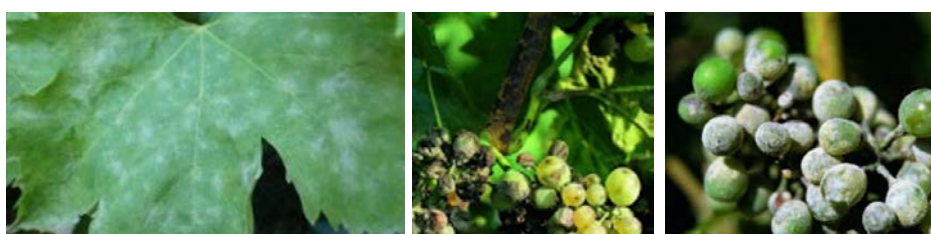


Figura I.2. Enfermedad del oídio en hoja, tallo y racimo de izquierda a derecha [14].

Por último, el mildium, o mildiu, es una enfermedad producida por el hongo *Plasmopara viticola* considerada como una de las peores enfermedades del cultivo, siempre y cuando estén en las condiciones ambientales favorables para su desarrollo. Dichas condiciones óptimas para la propagación de la enfermedad son las lluvias al amanecer o al anochecer, con una temperatura en un rango de 20-25 °C. El período sensible de la vegetación de la viña es a partir de una longitud de 10 cm en adelante, siendo máxima en el período de mayor crecimiento de la planta. Por otro lado, la sensibilidad del racimo empieza desde su formación hasta que las uvas, al florecer, alcanzan el tamaño similar al de un guisante, pero de ahí en adelante la sensibilidad se ve disminuida. Dicho hongo cuenta con un ciclo reproductivo abarcando varias fases, desde la fase de contaminación siendo el principio, hasta la fase de propagación. Afecta a todos los órganos verdes de la vid y sus síntomas son variados en las distintas zonas de ésta. En las caras de las hojas aparecen unas manchas amarillentas, en los racimos cuando se aproxima la floración, los que se encuentran infectados se curvan secándose y cubriéndose de una pelusa blanquecina, y cuando alcanzan el tamaño de un guisante en adelante, las uvas de los racimos afectados se van oscureciendo y secando sin que aparezca la fructificación del hongo, además de oscurecerse el tallo [15].

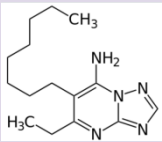
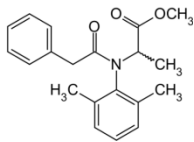
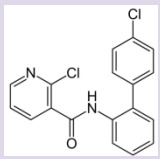
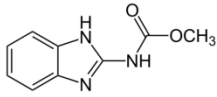
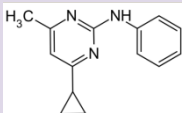
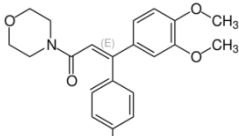
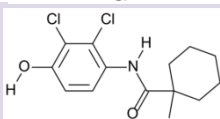
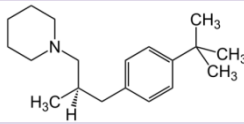
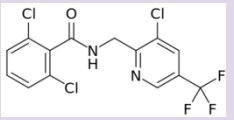
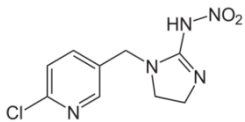
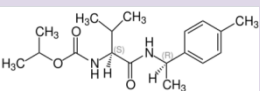


Figura I.3. Enfermedad del mildium; en la imagen de la izquierda: cómo afecta a las hojas; imagen central: cómo afecta a los racimos cuándo están infectados al comenzar la floración; y en la imagen de la derecha: cómo afecta a los racimos en dónde las uvas tienen tamaño mayor al de un guisante [16].

1.2. Estructura, propiedades físico-químicas y clasificación.

En este trabajo, nos centramos en estudiar los residuos de veintitrés fitosanitarios tipo fungicida principalmente, aunque también algún residuo tipo insecticida. Las características más importantes de dichos compuestos serán recogidas en la **Tabla I.1.** que incluye : estructuras, clasificación (se ha usado el acrónimo “F” en caso de ser fungicidas, e “I” en caso de ser insecticidas) y propiedades físico-químicas. Las propiedades físico-químicas que pueden resultar más relevantes para este estudio son el pKa, ya que la mayoría se trata de compuestos básicos aunque se encuentre algún ácido débil como es, por ejemplo, el Fenhexamid, y K_{ow} , describiendo el coeficiente de reparto entre octanol/agua, empleado para medir el grado de hidrofobidad, que proporciona una estimación de la posible distribución del analito entre materia orgánica y agua.

Tabla I.1. Estructura, clasificación y propiedades físico-químicas de interés para los analitos de estudio.

Compuesto	Estructura	Nombre sistemático	Fórmula	CAS	Uso	^a log (k _{ow})	pKa
Ametoctradin (AME)		5-ethyl-6-octyl[1,2,4]triazolo[1,5-a]pyrimidin-7-amine	C ₁₅ H ₂₅ N ₅	865318-97-4	F	4,40	2,78
Benalaxyl (BEN)		Methyl-N-(phenylacetyl)-N-(2,6-xylyl)-D-alaninate	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	98243-83-5	F	3,68	-
Boscalid (BOS)		2-Chloro-N-(4'-chlorobiphenyl-2-yl)-nicotinamide	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	188425-85-6	F	2,96	-
Carbendazim (CAR)		Methyl 2-benzimidazole carbamate	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	10605-21-7	F	1,48	4,20
Cyprodinil (CYP)		4-Cyclopropyl-6-methyl-N-phenylpyrimidin-2-amine	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	121552-61-2	F	4,00	3,09
Dimethomorph (DIM)		(2E)-3-(4-chlorophenyl)-3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(morpholin-4-yl)prop-2-en-1-one	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	110488-70-5	F	2,68	-1,3
Fenhexamid (FEH)		N-(2,3-dichloro-4-hydroxyphenyl)-1-methylcyclohexanecarboxamide	C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ NO ₂	126833-17-8	F	3,51	7,3
Fenpropidin (FEP)		1-[(RS)-3-(4-tert-butylphenyl)-2-methylpropyl]piperidine	C ₁₉ H ₃₁ N	67306-00-7	F	2,6	10,13
Fluopicolid (FLU)		2,6-dichloro-N-[3-chloro-5-(trifluoromethyl)-2-pyridylmethyl]benzamide	C ₁₄ H ₈ Cl ₃ F ₃ N ₂ O	239110-15-7	F	2,9	-
Imidacloprid (IMI)		(E)-1-(6-chloro-3-pyridylmethyl)-N-nitroimidazolidin-2-ylideneamine	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	138261-41-3	I	0,57	-
Iprovalicarb (IPR)		Isopropyl (S)-2-methyl-1-[1-(p-tolyl)ethylcarbamoyl]propyl-carbamate	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	140923-17-7	F	3,2	-

Compuesto	Estructura	Nombre sistemático	Fórmula	CAS	Uso	^a log (k _{ow})	pKa
Mandipropamid (MAN)		2-(4-chlorophenyl)-N-[3-methoxy-4-(2-propynyloxy)phenethyl]-2-(2-propynyloxy)acetamide	C ₂₃ H ₂₂ ClNO ₄	374726-62-2	F	3,2	-
Metalaxyl (MET)		N-(2,6-dimethylphenyl)-N-(methoxyacetyl)-DL-alanine methyl ester	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	57837-19-1	F	1,75	0,00
Myclobutanil (MYC)		2-(4-chlorophenyl)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)hexanenitrile	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	88671-89-0	F	2,89	2,30
Penconazol (PEN)		1-[2-(2,4-dichlorophenyl)pentyl]-1H-1,2,4-triazole	C ₁₃ H ₁₃ Cl ₂ N ₃	66246-88-6	F	3,72	1,51
Pyraclostrobin (PYC)		Methyl {2-[1-(4-chlorophenyl)-1H-pyrazol-3-yloxymethyl]phenyl} methoxycarbamate	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	175013-18-0	F	3,99	-
Pyrimethanil (PYM)		4-6-dimethyl-N-phenyl-2-pyrimidinamine	C ₁₂ H ₁₃ N ₃	53112-28-0	F	2,84	3,52
Tebuconazol (TEC)		1-(4-chlorophenyl)-4,4-dimethyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-ylmethyl)-3-pentanol	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	107534-96-3	F	3,70	5,00
Tebufenozid (TEF)		3,5-dimethylbenzoic acid 1-(1,1-dimethylethyl)-2-(4-ethylbenzoyl)hidrazide	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	112410-23-8	I	4,25	-
Thiabendazol (TBZ)		2-(1,3-thiazol-4-yl)-1H-benzimidazole	C ₁₀ H ₇ N ₃ S	148-79-8	F	2,39	4,73
Thiamethoxam (TME)		3-[(2-chloro-5-thiazolyl)methyl]tetrahydro-5-methyl-N-nitro-4H-1,3,5-oxadiazin-4-imine	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	153719-23-4	I	-0,13	-
Thiophanate-methyl (THI-M)		DimethylN,N'-[1,2-phenylenebis(azanediylcarbonylthioyl)] dicarbamate	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S ₂	23564-05-8	F	1,45	7,28
Triadimenol (TRI)		1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanol	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	55219-65-3	F	3,18	-

^a Valores para la forma neutra.

1.3. Toxicidad de los pesticidas.

En los últimos años, el uso indiscriminado de pesticidas de síntesis en agricultura ha creado graves problemas de salud y medioambientales, ya que su uso, debido al aumento de la población y por consiguiente de la actividad agraria, se ha incrementado considerablemente. Durante las tres últimas décadas, una estimación dada por la Organización Mundial de la Salud y el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente, revela que aproximadamente cerca de 20,000 personas al año mueren, generalmente agricultores, por exposición continuada a alguno de estos tóxicos. En la mayoría de los casos, los agricultores utilizan los pesticidas de forma que las cantidades se desvían significativamente de las recomendadas, ya que asocian cantidades más altas con mayor efectividad y velocidad de acción. El mal uso de dichos tóxicos se ve en los signos presentes en los ecosistemas afectados, pudiendo llegar a ser perjudiciales para la salud humana. Estos riesgos que causan, tanto en la salud como en el medioambiente, pueden ser reducidos o, en su defecto, evitados mediante la educación sobre este tipo de tóxicos con el fin de frenar su uso excesivo y descontrolado [17].

Desde el punto de vista medioambiental, los fitosanitarios empleados en un cultivo pueden persistir en los distintos medios; tierra, aire o agua, y afectar tanto a ecosistemas terrestres como acuáticos. En los sistemas terrestres, los suelos son contaminados mediante la aplicación del tóxico de forma directa o como deposición del resultado de una suspensión aérea. Éstos, pueden persistir desde varios días hasta varios años, ya que el suelo retiene y moviliza el tóxico después de su emisión. Los que persisten más tiempo en el medioambiente, tienen una mayor probabilidad de interactuar con otros elementos del sistema, y, si su vida media es mayor a la frecuencia con la que se aplica el pesticida, tienden a acumularse tanto en el suelo como en las especies que habitan en él. Por otro lado, el agua es contaminada por pesticidas bien por aplicación directa, por estar presentes en las precipitaciones de la atmósfera, o bien por la movilidad que tienen desde el suelo. Tanto los pesticidas solubles como los insolubles interactúan con los ecosistemas acuáticos, los hidrosolubles persisten más tiempo solubilizados en agua, mientras que los otros se asocian a los sedimentos y se concentran en las especies que habitan el medio acuático [18].

Como consecuencia de la amplia distribución de los tóxicos en aire, suelo y agua, se produce una acumulación de ellos en los elementos que contribuyen a la alimentación humana, ya que su amplio uso hace que el contacto con los plaguicidas por parte de personas y animales sea inevitable. La contaminación de los alimentos se puede presentar por aplicación directa de los pesticidas, el uso de éstos durante el manejo, transporte y almacenamiento de los productos comestibles, o por su acumulación en la cadena trófica. Son bioacumulables en el organismo debido a su carácter lipofílico, lo que les confiere una vida media en los tejidos larga. La exposición a pesticidas persistentes no tiene la misma repercusión en cada uno de los individuos expuestos, sino que se considera crítica la exposición durante la etapas embrionaria, fetal y primeros años de vida, en donde se transmite de madres a hijos mediante la gestación y la lactancia como resultado de la acumulación en el tejido graso de la madre [19].

1.4. Legislación.

El aumento del uso de fitosanitarios en actividades relacionadas con la producción de alimentos para consumo humano o animal, también desembocó en una preocupación social debido a su toxicidad y bioacumulación. En respuesta, la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS), pusieron en marcha un programa, Codex Alimentarius, cuyo objetivo, a través de sus normas y códigos de prácticas alimentarias internacionales, es garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos que están al alcance de cualquier persona. Con estas normas internacionales, los consumidores pueden confiar en la calidad de los alimentos independientemente de su origen geográfico [20].

Todos los alimentos destinados al consumo humano, o animal, en la Unión Europea, están sujetos a un límite máximo de residuos de plaguicidas para la protección de la salud humana y animal. Actualmente, en lo referente a legislación, para el control de la cantidad del tóxico en la uva, está vigente el Reglamento 396/2005 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 23 de febrero de 2005, referido a la regulación de los límites máximos de residuos de plaguicidas en alimentos y piensos de origen vegetal y animal. El límite máximo de residuos (LMR), se define como el nivel más alto de un residuo de un pesticida que se tolera de manera legal sobre los alimentos o piensos cuando se aplican correctamente. Las cantidades de residuos que se encuentren, deben ser lo más bajas posible para garantizar la seguridad en la alimentación de los consumidores. Dichos límites máximos de residuos, están fijados por la Comisión Europea pudiéndose encontrar en su base de datos LMR [21].

A continuación, en la **Tabla I.2.**, se resumen los LMRs de los compuestos de este estudio en uvas de vinificación, en unidades de mg/kg de uva. En el caso del vino no hay legislación en lo referente a estos pesticidas, solamente la recomendación de no superar el 10% del valor del LMR en uva.

Tabla I.2. Límites máximos de residuos permitidos para los compuestos estudiados en uvas.

Compuesto	LMRs (mg/kg uva)	Compuesto	LMRs (mg/kg uva)
AME	6	MET	1
BEN	0.3	MYC	1
BOS	5	PEN	0.2
CAR	0.5	PYC	2
CYP	3	PYM	5
DIM	3	TEC	1
FEH	15	TEF	3
FEP	0.01	TBZ	0.05
FLU	2	TME	0.4
IMI	1	THI-M	3
IPR	2	TRI	2
MAN	2		

2. MÉTODOS DE PREPARACIÓN DE MUESTRA APLICADOS A MUESTRAS DE VINO.

2.1. Extracción líquido-líquido (LLE).

Se entiende por extracción líquido-líquido, al método mediante el cual un analito de interés se separa por el contacto con otra fase en la cual tiene mayor afinidad, de la matriz en la que se halle. Los procesos de extracción implican dos fases y requieren tres pasos sucesivos: mezcla de materia prima y disolvente, separación de las dos fases después del contacto y eliminación del disolvente que contiene el analito [22].

La extracción líquido-líquido (LLE), se basa en la distribución de un analito entre dos fases líquidas inmiscibles, en las cuales, analito y matriz, tienen solubilidades diferentes. Principalmente, una de las fases es un medio acuoso, en general se trata de la muestra, y la otra un disolvente orgánico. La selectividad y eficacia de este método, vienen determinadas por la elección del disolvente y por los factores que pueden afectar al proceso de equilibrio (pH, adicción de sales neutras en la fase acuosa para reducir la solubilidad del analito, etc.) [23]. Esta técnica permite llevar a cabo extracciones para un rango muy amplio de analitos, siendo una de las más antiguas para la preparación de muestras en el análisis cualitativo y cuantitativo. Ofrece grandes capacidades de muestreo lineal y cuenta con la ventaja de la cantidad de información existente sobre este método [24].

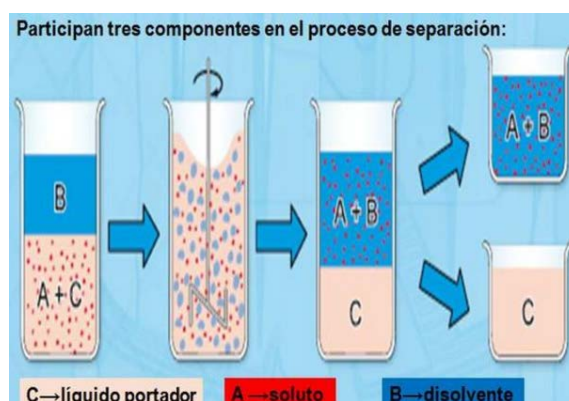


Figura I.4. Fundamentos teóricos de la LLE [25].

2.2. Extracción en fase sólida (SPE).

En 1978 aparecieron los primeros cartuchos desechables para la extracción en fase sólida, y actualmente, casi 40 años después, la extracción en fase sólida (SPE) es la técnica de preparación de muestras más empleada en los laboratorios. Es una técnica de preparación y tratamiento de muestras que se basa en la retención, en una fase adsorbente, del analito de interés presente en una muestra líquida que pasa a través de ella. Debido a la variedad de formatos (discos, cartuchos y jeringas) y tipos de adsorbentes (los más comunes: carbón activo, alúmina, sílica gel, silicato de magnesio, sílices enlazadas y polímeros, como por ejemplo, estinero-divinilbenceno), o la facilidad de automatización y acoplamiento con otras técnicas, como por ejemplo, una conexión directa con un sistema de

cromatografía, este método le fue ganando terreno a la LLE. Otra ventaja muy importante de la SPE frente a la LLE, es la disminución en la cantidad de disolvente orgánico empleada. Cada vez se va innovando más sobre esta técnica, llegando a encontrarse fases adsorbentes, formadas por polímeros, capaces de retener en un único cartucho un amplio abanico de analitos, lipofílicos o hidrofóbicos, ácidos, básicos o neutros [26].

El fundamento de esta extracción, como se puede en la Figura I.6, consiste en cuatro etapas: acondicionamiento, adicción de muestra, retención y elución de los analitos de interés. En primer lugar, antes de empezar la extracción, se requiere una etapa de acondicionamiento para preparar el adsorbente, haciendo pasar un poco de disolvente para así interaccionar mejor con la muestra. Luego se hace pasar la muestra líquida por la fase sólida. Idealmente, el adsorbente retiene los analitos selectivamente a medida que va pasando la muestra y la matriz pasa sin ser retenida. Por último, los analitos se eluyen del adsorbente con un disolvente con el que tenga mayor afinidad [27].

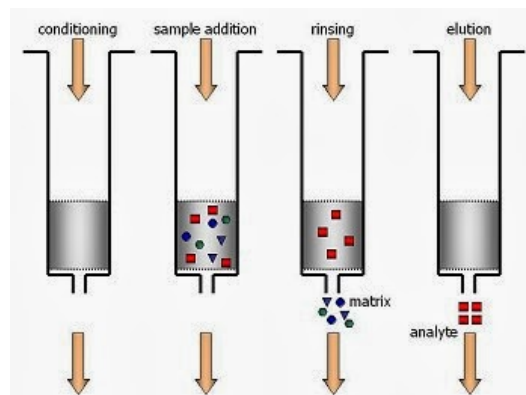


Figura I.6. Etapas de una SPE [28].

2.3. Técnicas de microextracción.

2.3.1. Microextracción en fase sólida (SPME).

En la microextracción en fase sólida (SPME) se utilizan fibras de sílice fundida revestidas con un polímero en un diseño en forma de jeringa, para la extracción de los analitos de interés. El principio por el que se rige esta extracción es el reparto del analito entre la matriz de la muestra y el revestimiento de la fibra mediante un proceso no competitivo. Se trata de un método que cuenta con muchas ventajas ya que se elimina completamente el uso de disolventes, y aparte, no son necesarios volúmenes de muestra grandes, pero también cuenta con algunas desventajas, ya que tanto la capacidad como la sensibilidad se ven limitadas [29].

En la figura I.7. podemos ver las etapas de la extracción. En un vial cerrado con una cápsula y un séptum tenemos la muestra, líquida o bien sólida que contenga los analitos de interés volátiles. Con la jeringa se perfora el séptum y, una vez dentro, se acciona el émbolo para la exposición de la fibra con los analitos introduciéndola en la muestra líquida, o, en su defecto, en el espacio de cabeza para la extracción de analitos volátiles de una muestra sólida. Después de la extracción, dentro del vial,

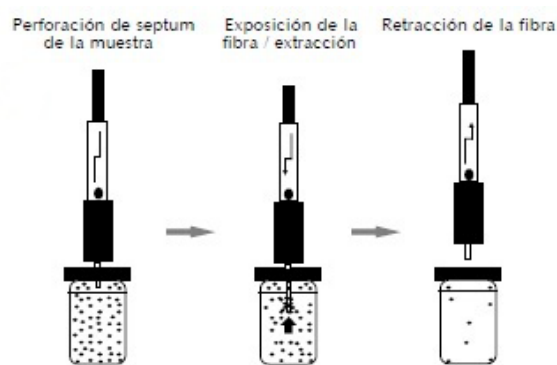


Figura I.7. Etapas de una SPME [30].

la fibra se introduce de nuevo en la jeringa y se retira del vial [27].

2.3.2. Microextracción en fase líquida (LPME).

La microextracción en fase líquida se desarrolló como una alternativa a la LLE para la reducción en la cantidad de disolventes orgánicos siendo rentable tanto para el medioambiente, como económicamente. Entre las modalidades más populares de esta técnica se encuentran: microextracción con gota suspendida (SDME) y microextracción líquido-líquido dispersiva (DLLME). En la SDME una gota de disolvente orgánico es expuesta al espacio de cabeza situado sobre una muestra en un vial, dicha gota es suspendida del extremo de una microjeringa. Por otro lado, la DLLME, sobre una muestra acuosa se inyecta un pequeño volumen de una mezcla de disolventes en la cual es dispersada formando una solución en la que se establece el equilibrio. El disolvente de extracción debe presentar una densidad inferior a la de la muestra para facilitar su recuperación, normalmente, después de centrifugar el vial dónde se realiza la extracción [31].

2.4. QuEChERS.

La extracción QuEChERS, de las palabras en inglés Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe, es un método de extracción que se desarrolló entre 2000 y 2002 para el análisis de pesticidas. Como su nombre indica, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro son las principales características de esta preparación de muestra. Se realiza en dos etapas, en primer lugar, una extracción simple, y una segunda fase de purificación. En la primera etapa, tenemos el vial con la muestra, en el cual se añade un disolvente, generalmente acetonitrilo, para la extracción de los analitos de interés en presencia de diferentes sales (en el método original se utiliza sulfato de magnesio y cloruro de sodio) para facilitar la separación de las fases. En la segunda parte, se realiza la purificación de la fracción del extracto orgánico. Para eso se lleva a cabo una limpieza de los analitos eliminando el agua y los compuestos presentes en la matriz de la muestra empleando un adsorbente: PSA (amina primaria y secundaria), C18, carbón negro grafitizado (GCB) o una combinación de éstas [32].

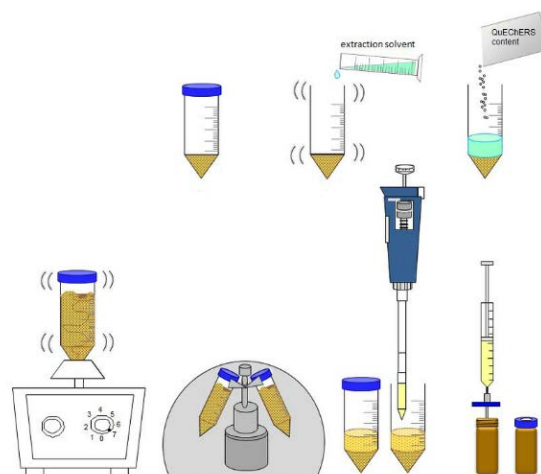


Figura I.8. Etapas de QuEChERS [33].

3. METODOLOGÍA ANALÍTICA PARA LA DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS.

3.1. Métodos de GC-MS (MS/MS).

La combinación de cromatografía de gases (GC), técnica de separación, con espectrometría de masas (MS) como sistema de detección, representa un potente método para la identificación, determinación y cuantificación de analitos orgánicos en concentraciones traza, presentes en muestras complejas. Esta técnica de análisis cuenta con muchas ventajas en sensibilidad, multifuncionalidad, buena reproducibilidad, robustez, así como facilidad en el manejo, pero con una gran desventaja; este método no es apto para ser utilizado con todos los analitos, sino que, se ve limitado a aquellos que sean termoestables y no se descompongan a temperaturas elevadas antes de ser volatilizados. La muestra es introducida, a través del inyector, en el cromatógrafo de gases, dónde, impulsada por una corriente de gas inerte como fase móvil, pasa a través de la columna, que contiene la fase estacionaria en la cual, se separan los compuestos debido a una distribución de estos entre fase móvil-fase estacionaria. Mediante una interfase, son introducidos para su detección en el espectrómetro de masas, que cuenta con una fuente de iones, analizador de masas y un detector [34].

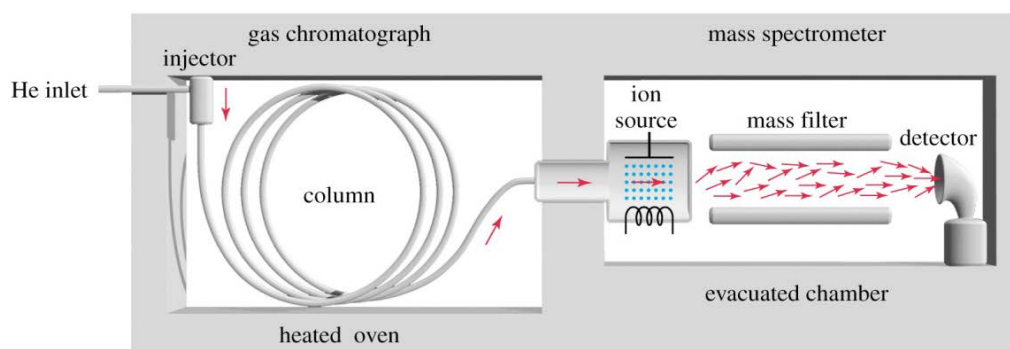


Figura I.9. Acoplamiento GC-MS [35].

La combinación de analizadores de masas en tándem (MS/MS) como sistema de detección en GC, es una técnica altamente selectiva, mejorando la sensibilidad y la relación señal-ruido en los espectros experimentando una mejora, por lo que se logran unos límites de detección inferiores. Esta técnica, GC-MS/MS, comprende más pasos; después de la separación por cromatografía, se lleva a cabo la detección con MS/MS, que consta de varias etapas: generación de iones en la fuente de ionización, selección de los iones precursores de una determinada masa, disociación causada por colisión con moléculas de gas inerte de los iones precursores y por último, el análisis de los fragmentos en relación a su masa/carga (m/z). En el caso de que un espectro de MS no permita confirmar la identidad de un determinado compuesto químico, la obtención de su espectro de MS/MS permite mejorar la confianza en su identificación [36].

3.2. Métodos LC-MS (MS/MS).

La técnica de LC-MS se desarrolló para minimizar las desventajas del acoplamiento GC-MS y, así, resolver los problemas que este último acarrea con los analitos termolábiles, permitiendo el análisis de éstos sin tener que realizar una etapa previa de derivatización. La interfase de unión de cromatografía líquida (LC) con espectrometría de masas (MS) acarrea una dificultad significativa, siendo responsable de transformar los analitos que se encontraban en la fase móvil líquida, en iones en fase gas sin que se produzca su degradación térmica. La sensibilidad de las determinaciones por LC-MS va a depender de la interfase empleada. Las principales interfases empleadas actualmente, son las ionizaciones a presión atmosférica: electrospray (ES) e ionización química a presión atmosférica (APCI) [37].

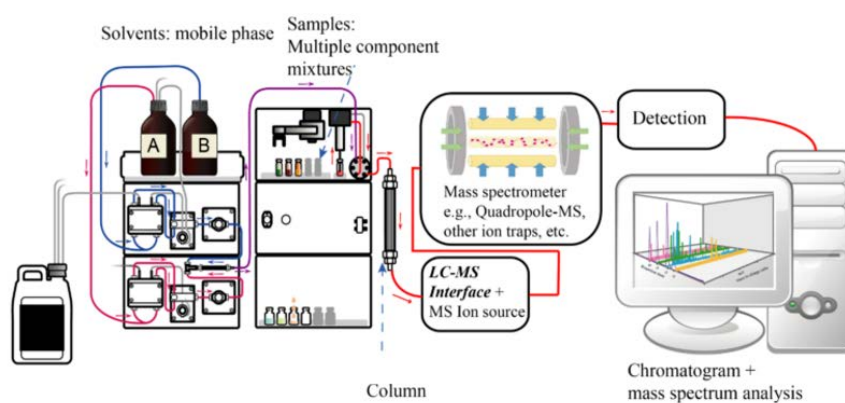


Figura I.10. Acoplamiento LC-MS [38].

Con los años, la cromatografía líquida se ha ido innovando, y, mediante la disminución del tamaño de partícula en la columna, se fue mejorando la eficiencia, así como, aumentando la selectividad y resolución del pico en el cromatograma. Para este nuevo sistema llamado UPLC, Ultra-Performance Liquid Chromatography, se desarrolló una nueva instrumentación capaz de trabajar a altas presiones, generando flujos mayores sin pérdidas de resolución, utilizando inyectores automáticos más rápidos y detectores con mayor velocidad de adquisición de datos, disminuyendo así el tiempo de análisis [39].

3.3. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es el método de detección y cuantificación más fiable a la hora de la determinación de compuestos en matrices complejas (tales como alimentos), ya que otros detectores más tradicionales, como UV-visible o fluorescencia, cuentan con una gran incertidumbre en los resultados, llegando incluso a ofrecer falsos

positivos o negativos. Un espectrómetro de masas cuenta con un dispositivo de introducción de muestra, una cámara de ionización, un sistema para la aceleración de los iones, uno o varios analizadores de masas y un detector [40].

El fundamento de la espectrometría de masas se basa en la separación de iones en base a la relación masa/carga (m/z). El proceso consta fundamentalmente de cuatro etapas. La primera es la ionización de la muestra, los iones formados se aceleran debido a la acción de un campo eléctrico variable; separación de los iones según su masa/carga; detección de los iones y producción de la señal eléctrica. El analizador de masas es el encargado de la separación de los iones en función a su m/z , entre los que más destacan: analizador de masas cuadrupolar, que, dispersa simultáneamente todos los iones en función de la relación m/z ; analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF), consta de un tubo a alto vacío sobre el que no actúa ningún campo eléctrico, al cual llegan todos los iones acelerados con la misma energía cinética y en el tubo las velocidades varían según m/z ; y analizador de trampa de iones, en donde, los iones gaseosos quedan aislados durante largos períodos de tiempo por la acción del campo eléctrico [41].

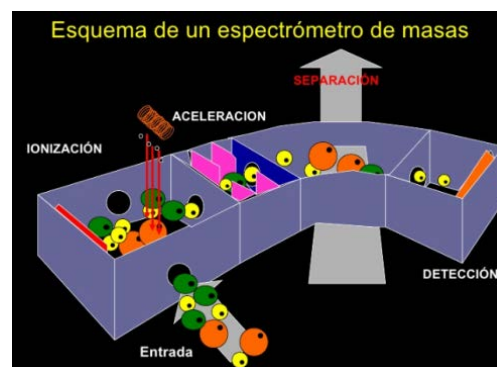


Figura I.11. Etapas de la espectrometría de masas [42].

4.RESUMEN BIBLIOGRÁFICO DE LAS TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS EN VINO.

En la bibliografía se han descrito diversas técnicas y diferentes combinaciones entre técnicas de extracción y distintas técnicas de cuantificación e identificación para esos analitos. Entre estas técnicas, los valores de los límites de cuantificación (LOQs) y las recuperaciones relativas pueden diferir en el resultado en un rango de valores así como el tiempo total empleado para el análisis y para la preparación de la muestra.

Por lo general, el método de extracción de los analitos de interés más empleado es la extracción en fase sólida (SPE), la cuál le ha estado ganando terreno a la extracción líquido-líquido, aunque también se está viendo, cada vez más, desplazada debido al creciente uso de la técnica QuEChERS.

En el estudio de ECONOMOU, et al. [43], realizado en el año 2009 en Grecia, se empleó la extracción en fase sólida con detección en cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (SPE-LC-ESI-MS/MS). Para la preparación de la muestra, diluyeron 10 mL de vino (tanto blanco como tinto) a un volumen final de 100 mL con agua ultrapura antes de la SPE. Determinaron las recuperaciones de la extracción para dos niveles de concentración, 0.010 y 0.050 mg/L, realizando 8 medidas diarias durante 3 días consecutivos encontrándose unos valores que varían dentro del rango 70-110% para todos los pesticidas en los dos niveles. Para la determinación y cuantificación de 46 pesticidas, emplearon la técnica de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas, con un volumen de inyección de 20 μ L y un flujo de fase móvil de 0,2 mL/min, acoplada a espectrometría de masas en tándem.

Con la misma técnica de extracción, PELAJIĆ, et al. [45], durante el año 2015 en Croacia, llevaron a cabo la determinación de 25 residuos de plaguicidas en vino tinto. El método que desarrollaron para dicha finalidad fue el acoplamiento SPE-GC-MS. Para la preparación de la muestra, emplearon 10 mL de vino diluidos 1:1 con agua ultrapura hasta un volumen final de 20 mL. Calcularon las recuperaciones de la extracción y se encontró un rango para todos los pesticidas en las muestras de 70-120%. Para la determinación en cromatografía de gases-espectrometría de masas se empleó un volumen de inyección de 5 μ L y un flujo de fase móvil de 1,0 mL/min.

Mediante el acoplamiento de técnicas SPE dispersiva-GC-MS, WALORCZYK, et al [48], en el año 2011 en Polonia, llevaron a cabo la cuantificación de 160 pesticidas en diferentes clases de vino; tinto, rosado y blanco. Con 10 g de vino y 10 mL de acetonitrilo, se realizaron pruebas de recuperación en la fase de extracción para vino tinto, con los niveles de concentración 0.01, 0.05 y 0.2 mg/kg, y para los vinos rosado y blanco, con el nivel de concentración 0.05mg/kg, y encontraron que, a todos los niveles de concentración, los valores de recuperación rondan el rango 80-110%. Para la técnica cromatográfica se utilizó un volumen de inyección de 5 μ L.

El acoplamiento LLE-SPE-LC/DAD fue desarrollado por GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, et al. [50] en el año 2010 en la provincia de Orense, para la determinación de nuevos fungicidas propuestos para combatir el hongo que provoca la enfermedad del mildium. En la preparación de la muestra, emplearon 15 mL de vino blanco para la extracción, en la cual fueron calculadas las recuperaciones relativas para dos niveles de concentración, 0.05 y 0.5 mg/kg, en donde se establece un rango de entre 70-110% para todos los analitos. Para la determinación mediante cromatografía de líquidos se empleó un volumen de inyección de 2 μ L y como método de detección utilizaron un detector de diodos array.

La microextracción sorptiva en fase sólida fue empleada en la publicación de FONTANA, et al [44] junto con un acoplamiento entre cromatografía de líquidos y espectrometría de masas, para la determinación de 15 fungicidas en vino, realizada durante el 2010 en el noroeste de España. Para la preparación de la muestra, emplearon 10 mL

de vino diluídos con el mismo volumen de agua ultrapura y un sorbente en forma de disco de silicona con un volumen de 12 μL . La recuperación de la extracción se calculó para vino tinto (Mencia) y vino blanco (Godello): realizando tres replicas dentro de un mismo día para los niveles de concentración 10 y 50 ng/mL; y nueve réplicas realizando el análisis en tres días consecutivos para el nivel de concentración de 25 ng/mL, y los resultados obtenidos dan unos valores de recuperación dentro del rango 75-117 %. En el sistema LC-QTOF-MS el volumen de inyección fue de 15 μL .

El otro método de extracción mencionado anteriormente es QuEChERS, está en auge como método de extracción de residuos de pesticidas en matrices como la del vino o la uva ya que incrementa la velocidad del análisis y reduce el efecto de matriz. BUERGE, et al. [46], seguido de una detección mediante GC-MS/MS, realizaron una etapa de extracción QuEChERS con alguna modificación, acetato de sodio en lugar de cloruro sódico y acetato de etilo en lugar de acetonitrilo, utilizando 5 g de uva, para la determinación de residuos de 4 pesticidas durante el año 2016. Las recuperaciones de extracción resultaron ser valores entre 91-149% en uva, a distintos niveles de concentración: 0.05, 0.5 y 5 mg/kg.

Para la determinación de Ametotradin, HU, et al. [47], llevaron a cabo una extracción QuEChERS empleando 10 g de uva con detección mediante el acoplamiento UPLC-MS/MS utilizando un volumen de inyección de 5 μL y un flujo de fase móvil de 0,3 mL/min. Las recuperaciones de la extracción se calcularon para tres niveles de concentración; 1, 10, 100 $\mu\text{g/L}$, de dos formas distintas: en tres días consecutivos, realizando 5 réplicas al día, o en dentro de un mismo día realizando 15 réplicas, los resultados de todos los cálculos se encuentran dentro del rango 81,8-100,1%.

Siguiendo con el mismo modo de extracción, GUO, et al. [49], publicaron sus estudios para la determinación de 50 pesticidas y 12 adulterantes en vino tinto. Para la extracción QuEChERS se utilizaron 10 mL de vino tinto con 10 mL de acetonitrilo, y calcularon las recuperaciones para tres niveles de concentración; 50, 100 y 250 ng/mL, encontrándose un rango de valores entre 75-120%. El método de detección se llevó a cabo mediante un análisis directo en tiempo real junto con espectrometría de masas en tandem con un cuadrupolo (DART-MS/MS), la técnica DART es un método rápido para cribar y cuantificar los analitos de estudio, que prescinde de la etapa de separación cromatográfica.

A continuación, se recogen en la **Tabla I.3** los límites de cuantificación (LOQs) de los analitos de interés en este trabajo, calculados por los diferentes métodos encontrados en bibliografía, citados anteriormente en este apartado.

Tabla I.3. LOQs de los analitos de interés descritos para los distintos métodos encontrados en la bibliografía.

Compuesto	LOQs			Compuesto	LOQs		
	V. Blanco	V. Tinto	Uva		V. Blanco	V. Tinto	Uva
AME	-	-	0.032µg/kg[47]	MET	8.6 µg/L[43]; 2.2 µg/L[44]	8.9 µg/L[43]; 2.2 µg/L[44]; 5 µg/L[45]; 25.9 ng/mL[49];	0.01mg/kg[48]
BEN	0.2 µg/L[44]; 0.001 mg/L[50]	0.2 µg/L[44]; 0.01 µg/L[45]; 28.0ng/mL[49]	0.05 mg/kg[48]	MYC	3.0 µg/L[43]; 0.8 µg/L[44];	3.6 µg/L[43]; 1.0 µg/L[44]; 0.25 µg/L[45]; 33.1ng/mL[49]	0.01 mg/kg[48]
BOS	0.065 mg/L[50]	0.5 µg/L[45]; 107.6 ng/mL[49]	0.01 mg/kg[48]	PEN	5.6 µg/L[43]; 0.5 µg/L[44]	4.9 µg/L[43]; 0.4 µg/L[44]; 22.0ng/mL[49]	0.01 mg/kg[48]
CAR	-	38.6 ng/mL[49]	-	PYC	0.003mg/L[50]	0.7 µg/L[45]	0.01 mg/kg[48]
CYP	1.5 µg/L[43]; 0.4 µg/L[44]; 0.001 mg/L[50]	2.2 µg/L[43]; 0.6 µg/L[44]; 31.2 ng/mL[49]	0.01 mg/kg[48]	PYM	1.7 µg/L[43]	2.2 µg/L[43]; 1.0 µg/L[45]	0.01 mg/kg[48]
DIM	1.8 µg/L[43]	2.0 µg/L[43]	0.01 mg/kg[48]	TEC	0.3 µg/L[44];	0.3 µg/L[44]; 10 µg/L[45]; 16.0ng/mL[49]	0.01 mg/kg[48]
FEH	1.7 µg/L[43]	2.2 µg/L[43]; 93.8 ng/mL[49]	0.01 mg/kg[48]	TEF	-	87.6ng/mL[49]	-
FEP	-	-	0.02mg/kg[46]	TBZ	1.5µg/L [43]	2.9µg/L[43]	0.01 mg/kg[48]
FLU		0.05 µg/L[45]		TME	-	25 µg/L[45]	0.01 mg/kg[48]
IMI	2.1 µg/L[43]	2.2 µg/L[43]; 22.5 ng/mL[49]	-	THI-M	9.2 µg/L[43]	8.9 µg/L[43]	-
IPR	0.7 µg/L[44]	0.7 µg/L[44]	0.01 mg/kg[48]	TRI	1.0 µg/L[44]	1.2 µg/L[44]	0.01 mg/kg[48]
MAN	0.011 mg/L[50]	-	-				

5. DISTRIBUCIÓN DE PESTICIDAS EN VINOS COMERCIALES.

En algunos de los métodos descritos en el apartado anterior, se procesaron vinos comerciales, encontrándose resultados positivos para muchos residuos de pesticidas, y algunos hasta en gran concentración.

ECONOMOU, et al. [43], mediante el método LC-ESI-MS/MS, realizaron el análisis de 60 muestras de vino tinto y blanco recogidos en supermercados locales en Grecia, a lo largo de un año. El método se había desarrollado

para la determinación de 46 pesticidas, pero la mayoría se encuentran con una concentración por debajo de 0.01mg/L, solo ocho plaguicidas se obtuvieron con resultados de concentración mayores. Se muestran los resultados en la **Tabla I.4.** de los analitos de interés en este estudio.

Tabla I.4. Número de muestras positivas de distintos pesticidas en el análisis de 60 muestras de vino [43].

Compuesto	Positivos con concentración entre 0.01-0.1	Positivos con concentración entre 0.1-1
	mg/L	mg/L
PYM	2 (3%)	2 (3%)
MYC	2 (3%)	0 (0%)
CAR	11 (18%)	7 (12%)
THI-M	7 (12%)	5 (8%)
FEH	5 (8%)	0 (0%)
MET	1 (2%)	0 (0%)

Mediante el método de microextracción en fase sólida-LC-TOF-MS, FONTANA, et al [44], aplicaron el desarrollo del procedimiento a un total de 12 vinos jóvenes elaborados en el 2010 y correspondientes a diferentes denominaciones geográficas del noroeste de España. En la **Tabla I.5.** se muestran los datos que han obtenido.

Tabla I.5. Determinación de fitosanitarios en vinos comerciales mediante Microextracción en fase sólida-LC-TOF-MS. Valores de concentración en ng/mL [44].

*	W 1	W5	W6	R1	R3	R4
Pesticidas	Albariño	Ribeiro	Valdeorras	Ribeira Sacra	Ribeiro	Valdeorras
MET	40.4±0.6	22.3±0.5	3.11±0.07	2.5±0.3	3.1±0.3	7.4±1.0
TRI	n.d.**	n.d.	3.6±0.6	n.d.	n.d.	<LOQ
IPR	39.4±0.3	3.24±0.2	3.24±0.2	0.71±0.07	3.1±0.2	2.8±0.5
MYC	n.d.	n.d.	n.d.	<LOQ	3.9±0.2	n.d.
TEC	2.5±0.1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CYP	17.9±0.8	<LOQ	<LOQ	5.62±0.02	0.83±0.01	n.d.
BEN	0.42±0.01	n.d.	<LOQ	n.d.	0.32±0.01	<LOQ

** n.d.No detectados; <LOQ por debajo del límite de cuantificación del método ,los códigos W y R corresponden respectivamente a los vinos blanco y tinto

Por último, PELAJIĆ, et al. [45], aplicaron su método SPE dispersiva-GC-MS, mediante el cual determinaron 25 residuos de plaguicidas en vino tinto, a un total de 32 muestras de vino adquiridos en supermercados locales de Croacia, pero de diversos orígenes de procedencia. Los resultados que han obtenido se muestran en la **Tabla I.6.**, en dónde, un total de 15 plaguicidas han sido detectados y 7 de los cuales se encontraban en una alta concentración.

Tabla I.6. Resultados de los vinos con positivos en pesticidas y sus concentraciones [45].

Vino	País	Residuos de pesticidas (mg/Kg)
Tinto	Francia	DIM (0,013), MET (0,009), IPR (0,01)
Tinto	Alemania	BOS (0,011)
Tinto	Alemania	IPR (0,009)
Tinto	Macedonia	MET (0,015)
Tinto	Moldavia	IPR (0,008)
Tinto	Polonia	MET (0,04)
Tinto	Rumania	PYM (0,058)
Tinto	España	TRI (0,005), MET (0,011)
Tinto	Estados Unidos	BOS (0,01)
Rosado	Francia	BOS (0,005)
Blanco	Chile	TEC (0,008)
Blanco	Georgia	MET (0,057)
Blanco	Alemania	DIM (0,01), IPR (0,054), PYM (0,056)
Blanco	Sudáfrica	DIM (0,011), IPR (0,011)

CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y DISCUSIÓN.

El objetivo principal que se persigue en este trabajo es el desarrollo de un método analítico rápido, basado en la extracción en fase sólida (SPE) y detección mediante cromatografía de líquidos, en la modalidad de UPLC, acoplada a la espectrometría de masas en tándem (UPLC-MS/MS), para la determinación multianalito de residuos de fitosanitarios, principalmente fungicidas aunque también algún insecticida, en muestras de vino blanco y tinto.

Para llevar a cabo la finalidad de lo dicho, se consideran unos objetivos más específicos:

- ❖ Minimizar la manipulación de la muestra, para así reducir la cantidad de disolventes y tiempo empleado.
- ❖ Optimización de los factores que afectan en la extracción en la SPE, tales como: tipo y cantidad de adsorbente, volumen de eluyente, etc.
- ❖ Estudio de las condiciones en UPLC-MS/MS para una separación y cuantificación óptimas.
- ❖ Caracterización y validación del método propuesto.

Por último, una vez cumplidos todos los objetivos anteriores y fijadas las condiciones óptimas, el método estudiado se aplica en el análisis de muestras de vino comercial (blanco y tinto) para determinar si se encuentran residuos presentes, así como, conocer en qué concentración se encuentran los pesticidas objeto de este estudio.

CAPÍTULO III. PARTE EXPERIMENTAL.

1. MATERIAL Y REACTIVOS.

1.1. Material.

- Material de vidrio de uso común en el laboratorio: vasos de precipitados, matraces aforados, etc.
- Micropipetas automáticas de 20-200 μL , 20-200 μL , 100-1000 μL , 1000-5000 μL , Eppendorf.
- Puntas de plástico para micropipetas.
- Encapsulador y desencapsulador.
- Soportes y pinzas.
- Viales de 1,5 mL transparentes para muestreador automático de cromatografía (Sugelabor)
- Cápsulas de aluminio con séptum de Teflón (Sugelabor) y tapones pre-slit para viales.
- Tubos y conectores de teflón.
- Cartuchos de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona 200 mg Oasis HLB, Waters.
- Cartuchos de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona funcionalizados con grupos amina cuaternaria, 150 mg Oasis MAX, Waters.
- Cartuchos de divinilbenceno-N-vinilpirrolidona, 60 mg Oasis HLB, Waters.

1.2. Reactivos y disolventes.

- Agua ultrapura Milli-Q.
- Ácido fórmico (Sigma Aldrich), 95%.
- Acetonitrilo (Lichrosolv®, Merck), Gradient grade for liquid chromatography.
- Metanol (Lichrosolv®, Merck), Gradient grade for liquid chromatography.
- Etanol (Lichrosolv®, Merck), Gradient grade for liquid chromatography.

1.3. Patrones.

- Ametocradin (AME), Dr. Ehrenstorfer, 99,0%.
- Benalaxyl (BEN), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,9%.

- Boscalid (BOS), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,9%.
- Carbendazim (CAR), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,2%.
- Cyprodinil (CYP), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,8%.
- Dimethomorph (DIM), mezcla de isómeros E + Z, Pestanal Sigma- Aldrich, 98,9%.
- Fenhexamid (FEH), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,7%.
- Fenpropidin (FEP), Dr. Ehrenstorfer, 98,0%.
- Fluopicolide (FLU), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,9%.
- Imidacloprid (IMI), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,9%.
- Iprovalicarb (IPR), mezcla de isómeros, Pestanal Sigma- Aldrich, 98,5%.
- Mandipropamid (MAN), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,1%.
- Metalaxyl (MET), Pestanal Sigma- Aldrich 99,0%.
- Myclobutanil (MYC), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,4%.
- Penconazole (PEN), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,1%.
- Pyraclostrobin (PYC), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,9%.
- Pyrimethanil (PYM), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,9%.
- Tebuconazol (TEC), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,6%.
- Tebufenozide (TEF), Dr. Ehrenstorfer, 98,8%.
- Thiabendazole (TBZ), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,9%.
- Thiamethoxam (TME), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,6%.
- Thiophanate-methyl (THI-M), Dr. Ehrenstrofer, 99,0%.
- Triadimenol (TRI), Mezcla de diastereoisómeros, Pestanal Sigma- Aldrich, 99,4%.

1.4. Patrones internos.

- Carbendazim-d₃ (CAR-d₃), Pestanal Sigma- Aldrich, 99,8%.
- Cyprodinil-d₅ (CYP-d₅), Pestanal Sigma- Aldrich.
- Imidacloprid-d₄ (IMID-d₄), Pestanal Sigma- Aldrich.
- Metalaxyl ¹³C₆ (MET¹³C₆), Pestanal Sigma-Aldrich, 99%.

1.5. Gases.

- Nitrógeno, 99,999 % como gas de colisión en el espectrómetro de masas.
- Nitrógeno en los sistemas de concentración y secado por corriente de nitrógeno de los cartuchos SPE.

2. INSTRUMENTACIÓN.

- Balanza analítica de precisión Sartorius.
- Granatario Sartorius.
- Baño de ultrasonidos P-Selecta.
- Equipo de purificación de agua Millipore, modelo Milli-Q gradient A-10ZMQSSVOT4.
- Estación de concentración por corriente de nitrógeno, Mini-Vap Supelco.
- Sistema de secado de cartuchos de SPE por corriente de nitrógeno, VisiDry Supelco.
- Sistema distribuidor de vacío Visiprep®, Supelco.
- Cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución Waters AcquityUPLC® y espectrómetro de masas Acquity TQD con analizador de triple cuadrupolo (QQQ), equipado con una fuente de ionización a presión atmosférica del tipo Z-spray (ESI).

3. PREPARACIÓN DE LAS DISOLUCIONES.

Los patrones de pesticidas se prepararon individualmente a partir de los compuestos sólidos comerciales por pesada, excepto en el caso del fenpropidin (FEP) que se preparó a partir del compuesto líquido comercial. Estos compuestos sólidos se disolvieron en metanol, y se obtuvieron unas disoluciones iniciales con concentraciones recogidas en la **Tabla III.1**.

Tabla III.1. Concentración de las disoluciones patrón stock.

Compuesto	Concentración (µg/mL)	Compuesto	Concentración (µg/mL)
AME	1022,01	MET	1189,12
BEN	1383,30	MYC	1020,17
BOS	994,74	PEN	1297,91
CAR	171,05	PYC	1045,81
CYP	1310,75	PYM	1413,86
DIM	1030,09	TEC	1347,29
FEH	995,84	TEF	1377,69
FEP	1000,00	TBZ	1059,28
FLU	1268,59	TME	1122,83
IMI	1011,23	THI-M	1242,02
IPR	1067,39	TRI	1189,33
MAN	1010,21		

4. LAVADO DEL MATERIAL.

La limpieza del material de vidrio utilizado en el laboratorio se realizó utilizando jabón y aclarando con agua de grifo. Luego, en primer lugar se realiza un enjuague con agua Milli-Q, finalmente, un segundo enjuague con acetona para eliminar posibles restos de compuestos orgánicos y se deja secar sobre papel.

Para la limpieza de los conectores de teflón empleados en el proceso de SPE, se introducen en un vaso de precipitados con metanol y este en un baño de ultrasonidos durante 10 minutos. Al finalizar con el baño de ultrasonidos se realiza un enjuague con acetona y se pone a secar.

5. EXTRACCIÓN DE MUESTRAS MEDIANTE SPE.

El método de extracción utilizado para la determinación de pesticidas fue la extracción en fase sólida (SPE) mediante cartuchos Oasis HLB de 200 mg. A continuación, se describe el protocolo de extracción en las condiciones óptimas:

1. Acondicionamiento del cartucho Oasis HLB de 200 mg con 2 mL de acetonitrilo, seguidos de otros 2 mL de vino sintético formado por la mezcla: etanol/agua MilliQ (12/88%).
2. Paso de la muestra: 2 mL de vino, diluídos con 2 mL de agua MilliQ, a través del cartucho por gravedad.
3. Lavado del cartucho con 2 mL de agua MilliQ.
4. Secado del cartucho durante 45 minutos en el VisiDry mediante el paso de una corriente de nitrógeno.
5. Elución del cartucho con la mezcla metanol/acetonitrilo, en proporción 20/80% , hasta un volumen final de 2 mL.
6. Análisis mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem, UPLC-MS/MS (volumen de inyección 1,5 μ L).

Representación esquematizada en la **Figura III.1**.

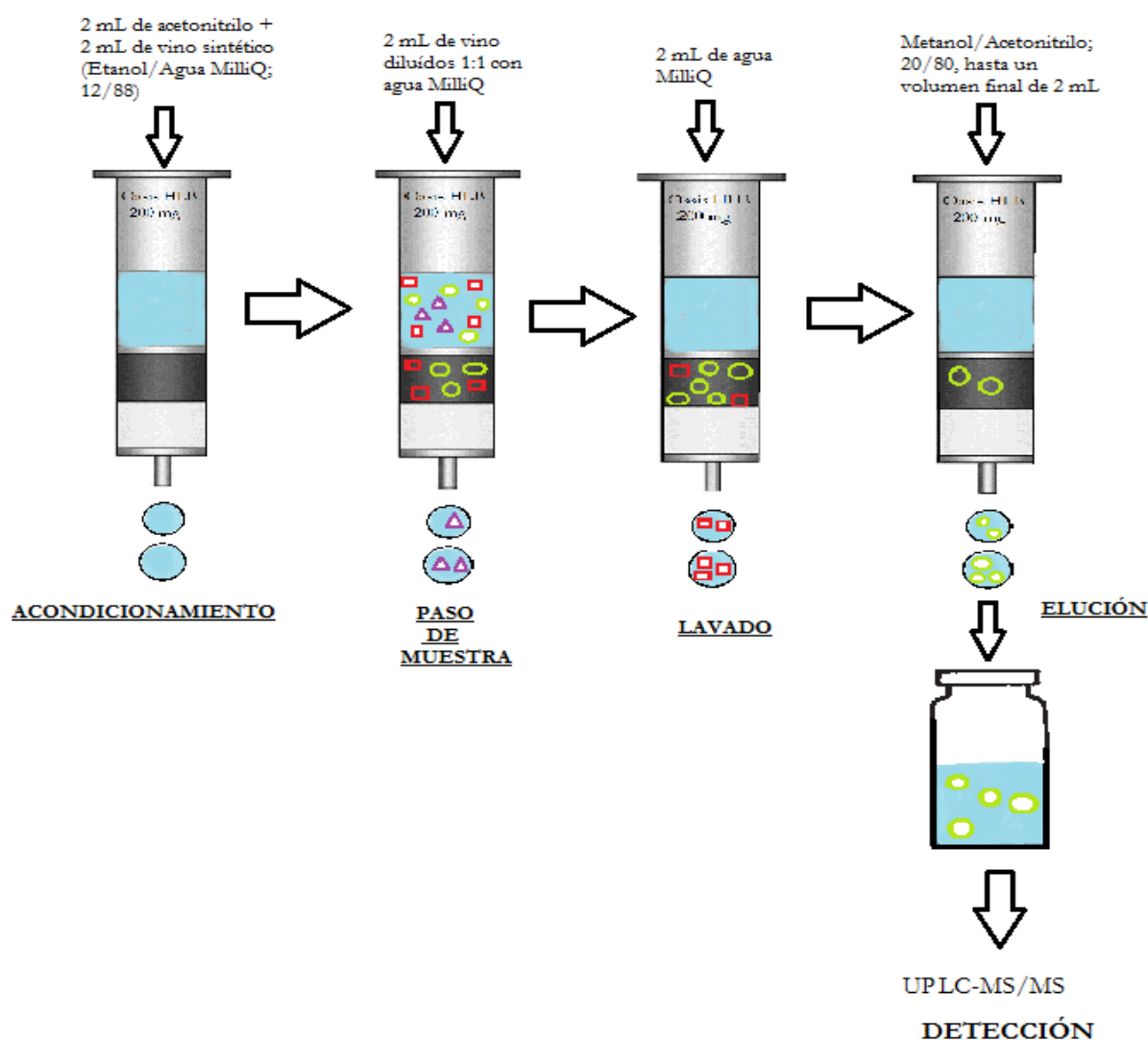


Figura III.1. Extracción en fase sólida (SPE) de las muestras de vino.

6. CONDICIONES DE DETERMINACIÓN MEDIANTE UPLC-MS/MS.

En la **Tabla III.2.** se indican las condiciones utilizadas en la determinación de los pesticidas de interés mediante LC-MS/MS y en la **Tabla III.3.** se muestra el gradiente de la fase móvil utilizado para la separación cromatográfica.

Tabla III.2. Condiciones experimentales de determinación en LC-MS/MS

UPLC	Acquity UPLC-I-Class IVD System
<ul style="list-style-type: none"> Columna cromatográfica 	Zorbax Eclipse Plus C18 Rapid Resolution HD
Fase estacionaria	C18
Dimensiones	2,1 x 50 mm
Tamaño de partícula	1,8 µm
Temperatura del horno	40°C
<ul style="list-style-type: none"> Inyector 	
Volumen de inyección	1,5 µL
<ul style="list-style-type: none"> Fase móvil 	
Flujo	0,4 mL/min
Fase acuosa (A)	Agua MilliQ con 0,1% ácido fórmico
Fase orgánica (B)	Acetonitrilo con 0,1% ácido fórmico
MS/MS	WatersXevo TQD
Modo de ionización	ESI positivo
Voltaje del capilar	1,5 kV
Voltaje de cono	50 V
Temperatura de gas de secado (N ₂)	450°C
Flujo de gas de secado (N ₂)	1000 L/h
Modo de adquisición	Centroide

Tabla III.3. Gradiente de fase móvil utilizado en la separación cromatográfica (LC).

Tiempo /min	0	1,3	2,8	6,4	7,5	7,6	10
%A	98	50	50	0	0	98	98
%B	2	50	50	100	100	2	2

CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

1. IDENTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS.

Para empezar el estudio, en primer lugar se realizó la caracterización de las condiciones de determinación de los analitos en el modo Multiple Reaction Monitoring (MRM), mediante UPLC-ESI-MS/MS. Para llevarla a cabo, se tomaron patrones individuales de cada fitosanitario y mediante infusión, se estudiaron las posibles transiciones y voltajes óptimos para su determinación (**Tabla IV.1.**).

La ionización por electrospray (ESI) se estudió tanto en modo positivo como en modo negativo, encontrándose que para todos los pesticidas de nuestro interés, se obtenía señal en el modo positivo, mientras el modo negativo no presentaba respuesta significativa.

A continuación, se estudia el efecto del voltaje de cono en la respuesta del ión molecular $[M+H]^+$, aumentándolo hasta alcanzar el valor máximo de la señal correspondiente a dicho ión, y luego se optimiza la energía de colisión variándola para cada analito, hasta obtener la señal de mayor intensidad para cada uno de los iones producto. Por último, una vez optimizado el voltaje de cono y la energía de colisión, se seleccionan las dos transiciones más intensas para llevar a cabo la cuantificación y cualificación de cada analito en modo MRM. Este procedimiento se realizó para la totalidad de los compuestos, confirmando los datos obtenidos con los facilitados por la base de datos Quanpedia, que está disponible en el software del equipo utilizado para algunos de los compuestos considerados.

Tabla IV.1. Tiempos de retención (Tr), relación de iones precursores (m/z), voltaje de cono (V), energías de colisión (CE) y relación de intensidades entre transiciones (IP2/IP1).

Compuesto	Tr (min)	Ion precursor (m/z, Da)	Voltaje de cono (V)	Ion producto 1 (CE,v) cuantificación	Ion producto 2 (CE,v) cualificación	Relación IP2/IP1
AME	3,25	276,0	60	176 (35)	70 (50)	0,16
BEN	4,85	326,1	26	148 (20)	91 (34)	0,67
BOS	3,87	342,9	41	140 (20)	307 (20)	0,11
CAR	1,67	192,1	33	160 (18)	132 (28)	0,14
CYP	3,11	226,0	56	93 (33)	108 (25)	0,61
DIM	3,22	388,1	40	301 (20)	165 (30)	0,57
FEH	3,86	302,1	41	97 (22)	55 (38)	0,44
FEP	2,57	274,2	55	147 (28)	86 (28)	0,93
FLU	4,01	383,0	40	173 (20)	365 (15)	0,10
IMI	2,18	256,1	34	209 (15)	175 (20)	0,91
IPR	3,58	321,1	28	119 (16)	203 (10)	0,42

Compuesto	Tr (min)	Ion precursor (m/z, Da)	Voltaje de cono (V)	Ion producto 1 (CE,v) cuantificación	Ion producto 2 (CE,v) cualificación	Relación IP2/IP1
MAN	3,92	412,0	25	328 (16)	125 (35)	0,63
MET	2,83	280,1	26	220 (13)	192 (17)	0,57
MYC	3,65	289,1	34	70 (18)	125 (32)	0,29
PEN	4,17	284,0	34	70 (16)	159 (34)	0,31
PYC	5,23	388,1	31	194 (12)	163 (25)	0,66
PYM	2,66	200,0	51	107 (24)	82 (24)	0,71
TEC	3,97	308,0	40	70 (22)	125 (40)	0,07
TEF	4,73	353,1	19	133 (20)	297 (8)	0,72
TBZ	1,82	202,0	51	175 (25)	131 (30)	0,62
TME	2,03	292,0	28	211 (12)	132 (22)	0,47
THI-M	2,57	343,0	28	151 (46)	93 (19)	0,001
TRI	3,19	296,1	21	70 (10)	99 (15)	0,13

El *dwell time* para cada una de las transiciones se ajustó de manera automática por el *software* (MassLinx) con objeto de obtener doce puntos espectrales por compuesto, tomando un valor promedio de cuatro segundos como ancho de pico a línea de base.

2. CARACTERIZACIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN (UPLC-ESI-MS/MS).

Una vez optimizados los parámetros que afectan a la separación cromatográfica (UPLC) y a la determinación por espectrometría de masas en tándem (MS/MS), se lleva a cabo la evaluación de la repetibilidad de inyección y determinación en esas condiciones. Se expresa por medio de la desviación estándar relativa (RSD), parámetro que nos indica el grado de correlación que existe entre varias medidas del mismo patrón, realizadas por el mismo operador en el laboratorio y en el mismo equipo de medida a lo largo de un día. Para el estudio, se realizan diez inyecciones, con volumen de 1.5 µL, de dos patrones con distintos niveles de concentración: 5 y 20 ng/mL. Los datos de RSD (**Tabla IV.2.**) para las áreas de pico de los analitos, se sitúan para el nivel de concentración 5 ng/mL en el rango 2-13%, y en el nivel de concentración 20 ng/mL, en el rango 1-7%.

Tabla IV.2. Desviación estándar relativa (RSD,%) del área de pico (transición de cuantificación) para evaluar la repetibilidad del proceso de LC-MS/MS.

Compuesto	%RSD 5 ng/mL	%RSD 20 ng/mL	Compuesto	%RSD 5 ng/mL	%RSD 20 ng/mL
AME	5	2	MET	3	2
BEN	2	2	MYC	9	2
BOS	4	5	PEN	4	4
CAR	4	2	PYC	3	1
CYP	5	7	PYM	7	3
DIM	6	5	TEC	3	2
FEH	7	4	TEF	4	2
FEP	4	2	TBZ	2	1
FLU	5	3	TME	6	6
IMI	13	7	THI-M	a	6
IPR	8	2	TRI	8	6
MAN	3	2	a: no evaluado, ya que se encuentra por debajo del límite de cuantificación del método		

A continuación, también se evaluó la repetibilidad de los tiempos de retención (T_r) para diez inyecciones de patrones a los dos niveles de concentración 5 y 20 ng/mL, situándose las RSD para todos los compuestos en el rango 0,1-0,3%. En base a este dato, la ventana de tiempo en la que se registran las transiciones de MRM de cada compuesto se fijó en 0.5 min, lo que es lo mismo, 0.25 min alrededor del valor medio de su tiempo de retención.

Por otro lado, la linealidad del método se estudió a nueve niveles de concentración diferentes, comprendidos entre los niveles 0.5 ng/mL y 200 ng/mL, mediante la inyección de disoluciones patrón de los distintos compuestos de estudio. Se realizó una evaluación sin y otra con patrón interno (IS), añadiendo una concentración fija de patrones internos a nivel de 25 ng/mL, y pudimos observar que los resultados mejoran notablemente al realizar una corrección con el IS. En la **Tabla IV.3.** se muestran los coeficientes de determinación (R^2), obtenidos al realizar la corrección mediante IS, observando que para todos los compuestos, excepto para THI-M y para TRI, los coeficientes de correlación son superiores a 0.990, por lo que existe una respuesta lineal en el rango de concentraciones que hemos estudiado.

Aparte del estudio de la linealidad, también se han estudiado los límites de cuantificación instrumentales del método (LOQs). Para ello, los LOQs se evalúan como la mínima cantidad de analito que origina una señal 10 veces superior a la desviación estándar del ruido. Los valores anteriores se estimaron a partir del patrón de

concentración más baja que presenta un pico con una relación S/N superior a 10. En la **Tabla IV.3.** también se recogen estos LOQs, en dónde podemos ver que varían en el rango 0,1-1 ng/mL, excepto para THI-M, que se desvía a valores de 10 ng/mL.

Tabla IV.3. Coeficientes de determinación (R^2) y límites de cuantificación instrumentales (LOQs) de los analitos para nueve niveles de concentración de 0,5 a 200 ng/mL.

Compuesto	Coeficiente de correlación (R^2)	LOQs (ng/mL)	Compuesto	Coeficiente de correlación (R^2)	LOQs (ng/mL)
AME	0,9951	0,4	MET	0,9933	0,1
BEN	0,9949	0,1	MYC	0,9950	0,4
BOS	0,9979	0,2	PEN	0,9945	0,2
CAR	0,9923	0,2	PYC	0,9955	0,2
CYP	0,9878	0,2	PYM	0,9931	0,1
DIM	0,9938	0,7	TEC	0,9958	0,5
FEH	0,9959	0,5	TEF	0,9957	0,1
FEP	0,9931	0,1	TBZ	0,9942	0,2
FLU	0,9965	0,2	TME	0,9903	0,1
IMI	0,9979	0,5	THI-M	0,9580	10,0
IPR	0,9938	0,1	TRI	0,9867	0,7
MAN	0,9979	0,1			

En la **Figura IV.1.** y **Figura IV.2.** se muestran dos ejemplo de curvas de calibrado para dos compuestos; IMI y MAN, respectivamente.

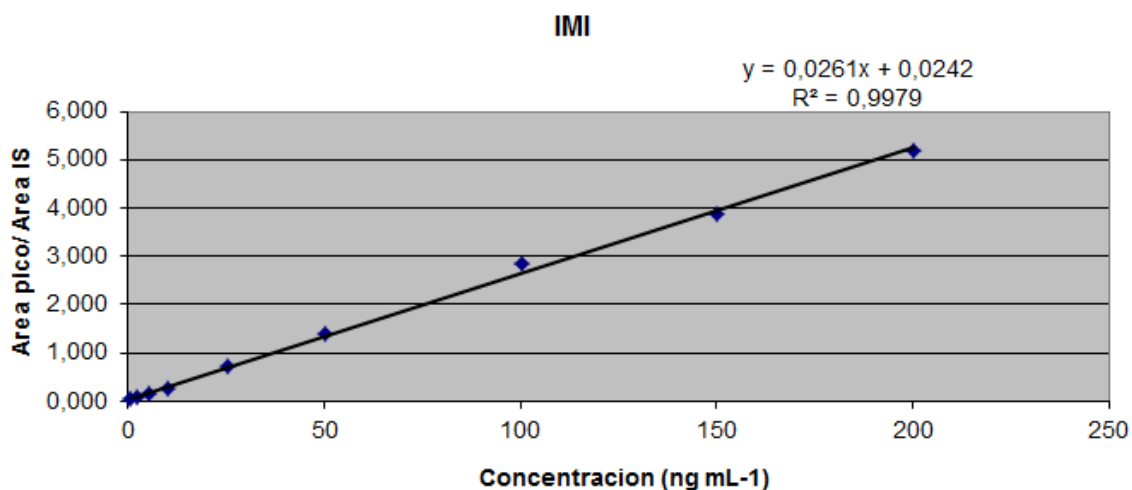


Figura IV.1. Curva de calibrado y coeficiente de determinación de IMI para UPLC-ESI-MS/MS.

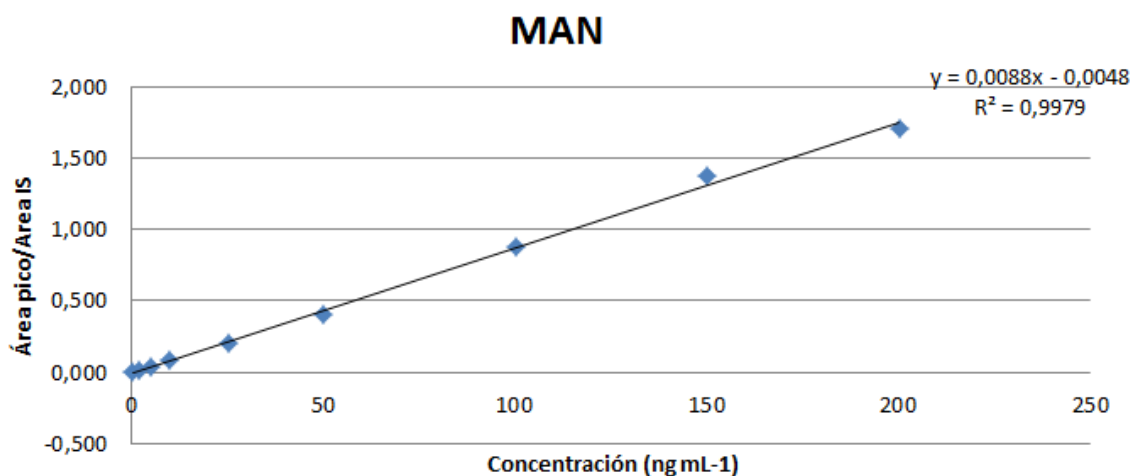


Figura IV.2. Curva de calibrado y coeficiente de determinación de MAN para UPLC-ESI-MS/MS.

3. ESTUDIO DEL MÉTODO SPE.

La extracción de pesticidas se llevó a cabo mediante extracción en fase sólida (SPE), en dónde, se realizaron diversos estudios con diferentes condiciones para dar con las óptimas. En primer lugar, se llevaron a cabo los experimentos de retención y elución sobre dos tipos distintos de adsorbentes, cartuchos OASIS HLB (200mg) y cartuchos OASIS MAX (150 mg), como fases potenciales en las que llevar a cabo la extracción de manera selectiva. Los dos tipos de cartuchos son de fase reversa, pero difieren entre sí en el fundamento de retención de los analitos. En los cartuchos OASIS HLB (200 mg), formados por divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (DVB-VP), la retención de los diferentes analitos tiene lugar por interacciones π - π o de Van der Waals, mientras que los cartuchos OASIS MAX (150 mg), que se probaron como alternativa para mejorar la selectividad en la extracción, cuentan con un adsorbente polimérico de modo mixto formado por divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (DVB-VP) funcionalizado con grupos amina cuaternaria, siendo el fundamento de la extracción, la combinación de las propiedades adsorbentes del cartucho HLB con un mecanismo adicional de intercambio iónico (aniónico) [27]. Algunos autores han empleado este mecanismo para mejorar la selectividad de la extracción de forma que en la etapa de elución ciertos pigmentos del vino quedan fuertemente retenidos en el adsorbente a diferencia de lo que ocurre con los adsorbentes de fase reversa [51].

Para llevar a cabo la elección del tipo de adsorbente, se realizaron pruebas con 10 mL de vino blanco y tinto conectando en serie los dos tipos de cartuchos, HLB (200 mg) y MAX (150 mg), a un segundo cartucho OASIS HLB (60 mg). La elución de los analitos se hace de forma independiente para cada cartucho y se evalúa si los analitos pasan del primer cartucho hacia el segundo cartucho, es decir, si se supera el volumen de corte, o si, por

otro lado, se quedan retenidos en el primero y no eluyen hacia el segundo. En estas pruebas de estudio preliminares de preparación de la muestra no se ha incluido el CYP.

En la **Figura IV.3.** podemos ver la eficacia de la extracción, para vino blanco y tinto, que obtenemos empleando cartuchos OASIS MAX (150 mg) conectados en serie con cartuchos OASIS HLB (60 mg), realizando la extracción de tres fracciones, de 2 mL cada una, del cartucho OASIS MAX (150 mg), y una cuarta fracción, de 2 mL, del cartucho OASIS HLB (60 mg).

Por otro lado, en la **Figura IV.4.** podemos ver un gráfico de columnas, en el cual, comparamos la eficacia de extracción de los cartuchos OASIS HLB (200 mg) con dos disolventes de elución distintos. En dicha gráfica, el acrónimo de cada compuesto consta de dos barras, cuyo significado es el siguiente: la barra de la izquierda indica la eficacia de la extracción empleando acetonitrilo (ACN) como disolvente de elución, y la barra de la derecha indica la eficacia de la extracción empleando la combinación Metanol:Acetonitrilo (20:80) (MeOH:ACN) como disolvente de elución. Para este adsorbente no se detectó ningún compuesto en la extracción del segundo cartuchos OASIS HLB (60 mg) empleando 2 mL de metanol.

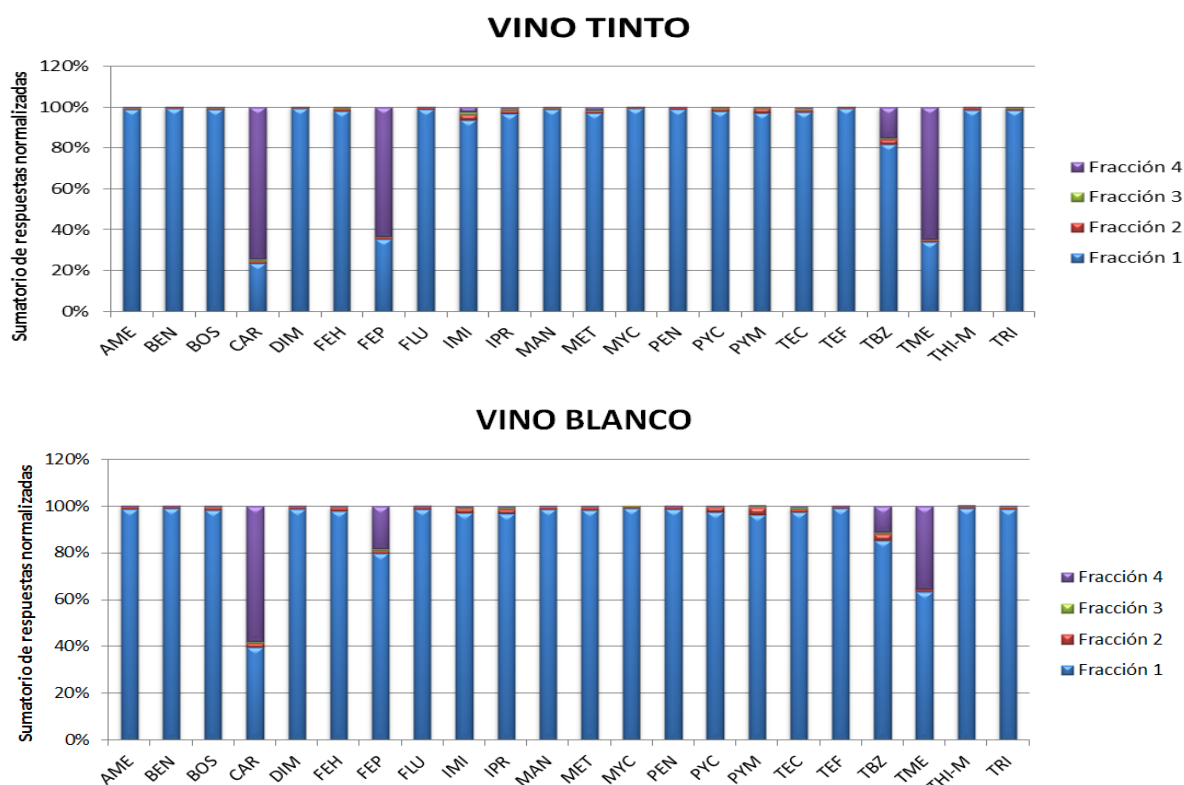
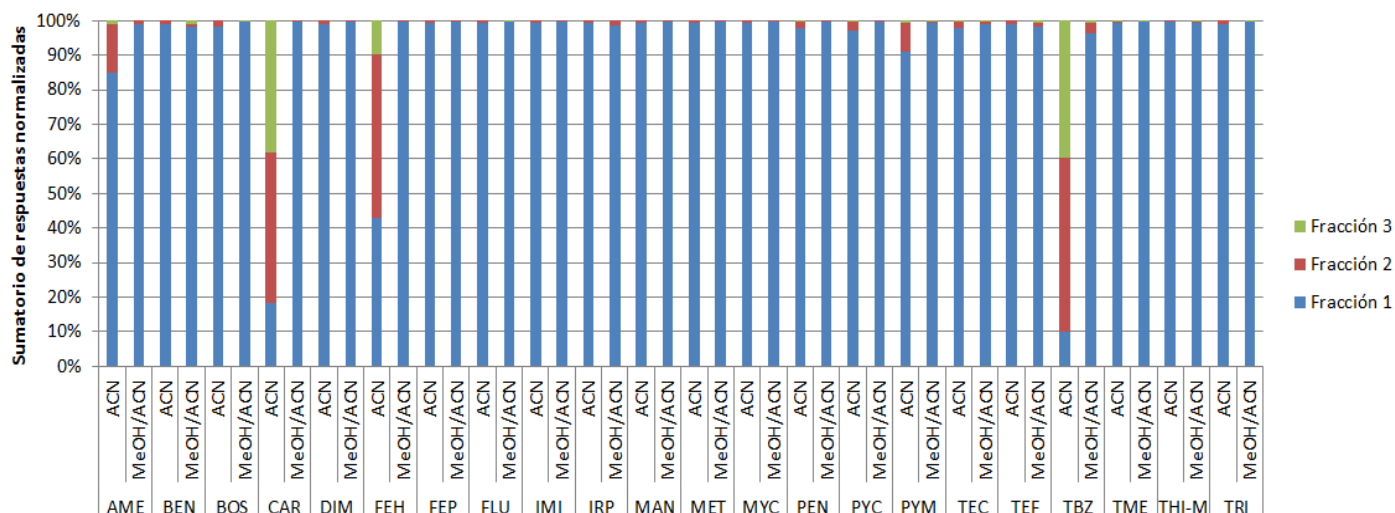


Figura IV.3. Distribución de los compuestos en cada fracción, obtenidas con cartuchos OASIS MAX (150 mg), utilizando 10 mL de vino, tinto y blanco, sacando cuatro fracciones de 2 mL cada una con metanol como disolvente de elución.

VINO TINTO



VINO BLANCO

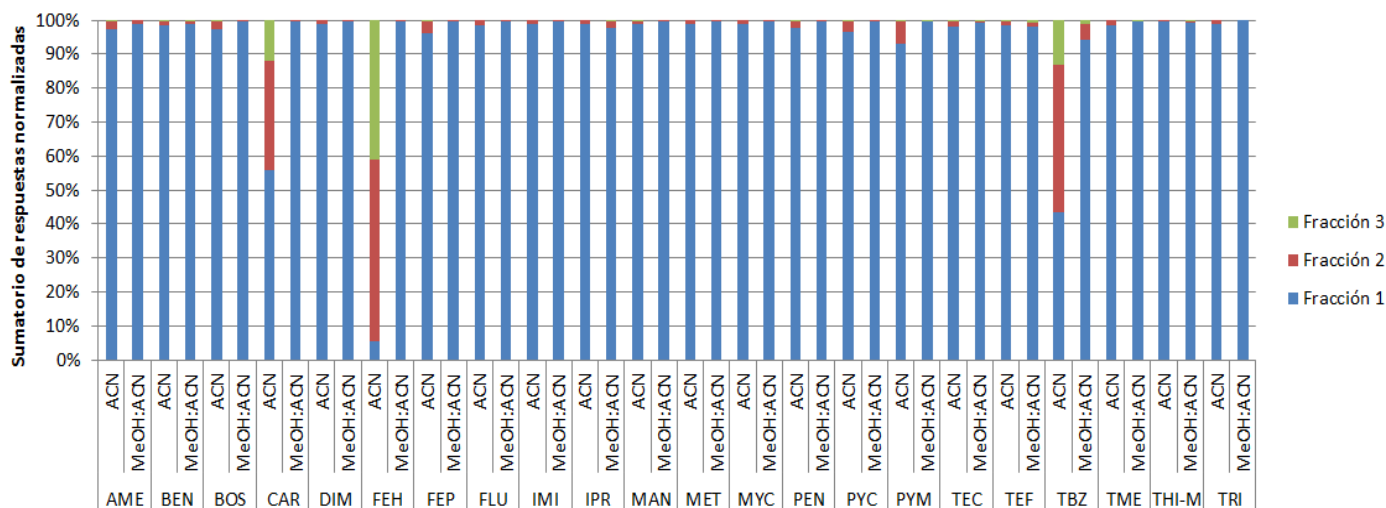


Figura IV.4. Distribución de los compuestos en cada fracción, obtenidas con cartuchos OASIS HLB (200 mg), utilizando 10 mL de vino tinto y blanco, sacando 3 fracciones de 2 mL cada una con acetonitrilo (ACN) (columna de la izquierda) y una combinación Metanol:Acetonitrilo (20:80) (MeOH:ACN) (columna de la derecha) como disolventes de elución.

A la vista de los resultados reflejados en las gráficas, podemos afirmar que cuando se utiliza el cartucho OASIS HLB (200 mg) eluyendo con acetonitrilo o la combinación metanol/acetonitrilo (20/80), los extractos son limpios y se eluyen la mayoría de los compuestos en la primera fracción. Pero utilizando acetonitrilo como disolvente de elución se encuentran problemas en la extracción de CAR, FEH y TBZ para los que es necesario emplear un volumen mayor de elución, o bien seleccionar otro disolvente de elución, como es la combinación metanol/acetonitrilo.

Por otro lado, los extractos en los cartuchos OASIS MAX (150 mg) son más limpios incluso utilizando metanol en la elución, pero se detecta la presencia de CAR, FEP, TBZ y TME en el segundo cartucho, OASIS HLB (60 mg), significando la rotura del primer cartucho para dichos analitos considerando un volumen de 10 mL de vino. Los demás compuestos se podrían recuperar cuantitativamente en la primera fracción sacada, pero la pérdida de estos compuestos inclina la elección hacia los cartuchos OASIS HLB (200 mg), con metanol/acetonitrilo (20/80) como disolvente de elución, para continuar con el estudio.

Una vez fijado el adsorbente y el volumen de elución, se prueba la eficacia de la SPE, independiente de los efectos de matriz. En la **Tabla IV.4.** se muestran las recuperaciones de la SPE tomando 10 mL de vino, blanco y tinto, con un nivel de adición de 15 ng/mL, sacando una sola fracción de 2 mL con la combinación metanol/acetonitrilo (20/80) y n=3 réplicas.

Tabla IV.4. Recuperaciones (%R \pm SD) de SPE para 10 mL de vino (blanco y tinto), con un nivel de adición de 15 ng/mL y n=3 réplicas.

Compuesto	Vino Tinto %R \pm SD	Vino Blanco %R \pm SD	Compuesto	Vino Tinto %R \pm SD	Vino Blanco %R \pm SD
AME	82 \pm 7	100 \pm 1	MET	92 \pm 6	94 \pm 3
BEN	89 \pm 6	97 \pm 3	MYC	90 \pm 9	86 \pm 4
BOS	95 \pm 1	100 \pm 2	PEN	84 \pm 10	103 \pm 3
CAR	91 \pm 6	104 \pm 6	PYC	86 \pm 5	106 \pm 1
CYP	81 \pm 7	102 \pm 3	PYM	87 \pm 12	94 \pm 3
DIM	97 \pm 3	86 \pm 4	TEC	83 \pm 10	103 \pm 1
FEH	89 \pm 3	88 \pm 3	TEF	84 \pm 5	108 \pm 4
FEP	91 \pm 7	104 \pm 3	TBZ	88 \pm 7	92 \pm 5
FLU	91 \pm 2	97 \pm 4	TME	101 \pm 1	110 \pm 13
IMI	117 \pm 8	101 \pm 11	THI-M	85 \pm 9	110 \pm 4
IPR	89 \pm 7	112 \pm 4	TRI	85 \pm 10	110 \pm 4
MAN	88 \pm 2	87 \pm 2			

Algunos compuestos de la matriz en el vino, pueden competir con los analitos durante el proceso de ionización que tiene lugar en la interfase entre UPLC-MS/MS, por lo que, para la cuantificación del rendimiento de la ionización por electrospray (ESI), se estudian los efectos de matriz (EM), para vino blanco y tinto, considerando dos volúmenes de muestra distintos, 2 y 10 mL, y un volumen final del extracto de 2 mL. En la **Tabla IV.5.** se

exponen los valores para cada compuesto, notando que al aumentar el volumen de muestra también se aumentan los efectos de matriz, y éstos siempre son mayores en vino tinto. Para el cálculo de estos efectos de matriz (EM) se emplea la siguiente ecuación:

$$EM (\%) = \frac{A_m - A_b}{A_p} \times 100$$

Donde A_m , A_b y A_p representan el área de pico en la señal medida del analito en el extracto de la muestra con adición, en el extracto de la muestra sin adición (o blanco) y en el patrón añadido, respectivamente. El nivel de adición en extracto fue de 50 ng/mL por compuesto.

Tabla IV.5. Efectos de matriz para vino blanco y tinto con un volumen inicial de 2 y 10 mL, evaluados para un nivel de adición de 50 ng/mL en extracto.

Compuesto	Vino blanco				Vino tinto			
	2 mL		10 mL		2mL		10 mL	
	EM (%)	CV (%)	EM (%)	CV (%)	EM (%)	CV (%)	EM (%)	CV(%)
AME	93	3	95	2	99	3	101	7
BEN	99	1	93	2	101	3	100	6
BOS	97	5	98	1	108	2	96	0
CAR	62	2	50	3	58	2	55	6
CYP	94	3	91	1	97	2	95	7
DIM	105	2	95	3	100	3	108	3
FEH	100	4	102	4	105	4	94	3
FEP	95	3	88	2	96	2	92	7
FLU	98	2	93	2	106	1	101	2
IMI	84	4	46	3	48	10	18	8
IPR	99	3	92	3	105	1	100	7
MAN	100	1	94	3	109	4	107	2
MET	98	1	89	1	99	2	99	6
MYC	105	1	100	1	103	2	96	9
PEN	98	3	97	1	101	3	99	10
PYC	98	2	92	3	102	2	98	5
PYM	95	2	87	1	94	3	85	12
TEC	95	3	99	1	101	1	102	10
TEF	99	1	92	3	101	2	104	5
TBZ	45	0	40	5	43	2	30	7
TME	60	6	19	16	36	4	16	1
THI-M	107	2	109	2	103	1	96	9
TRI	97	3	118	4	104	5	117	10

Al observar los resultados, podemos ver, que la mayoría de los compuestos dan resultados de EM en torno al 100 %, lo que significa que no sufren una modificación importante en la eficacia de ionización para las muestras con respecto a los patrones. Pero también, por el contrario, podemos observar que algunos compuestos, como por ejemplo en el caso de CAR, TBZ, IMI y TME, experimentan una gran supresión de señal, es decir, EM bajos, que se acentúan al aumentar el volumen de muestra. La atenuación en la eficacia de variación para estos cuatro compuestos, no solo se ve incrementada con el volumen de muestra si no que, además, es más significativa para vino tinto que para vino blanco. En base a estos resultados, aunque la eficacia de la SPE fue cuantitativa para muestras de 10 mL se limitó el volumen de muestra a extraer a 2 mL.

Las condiciones óptimas de extracción se esquematizan en un resumen en la **Figura IV.5**.

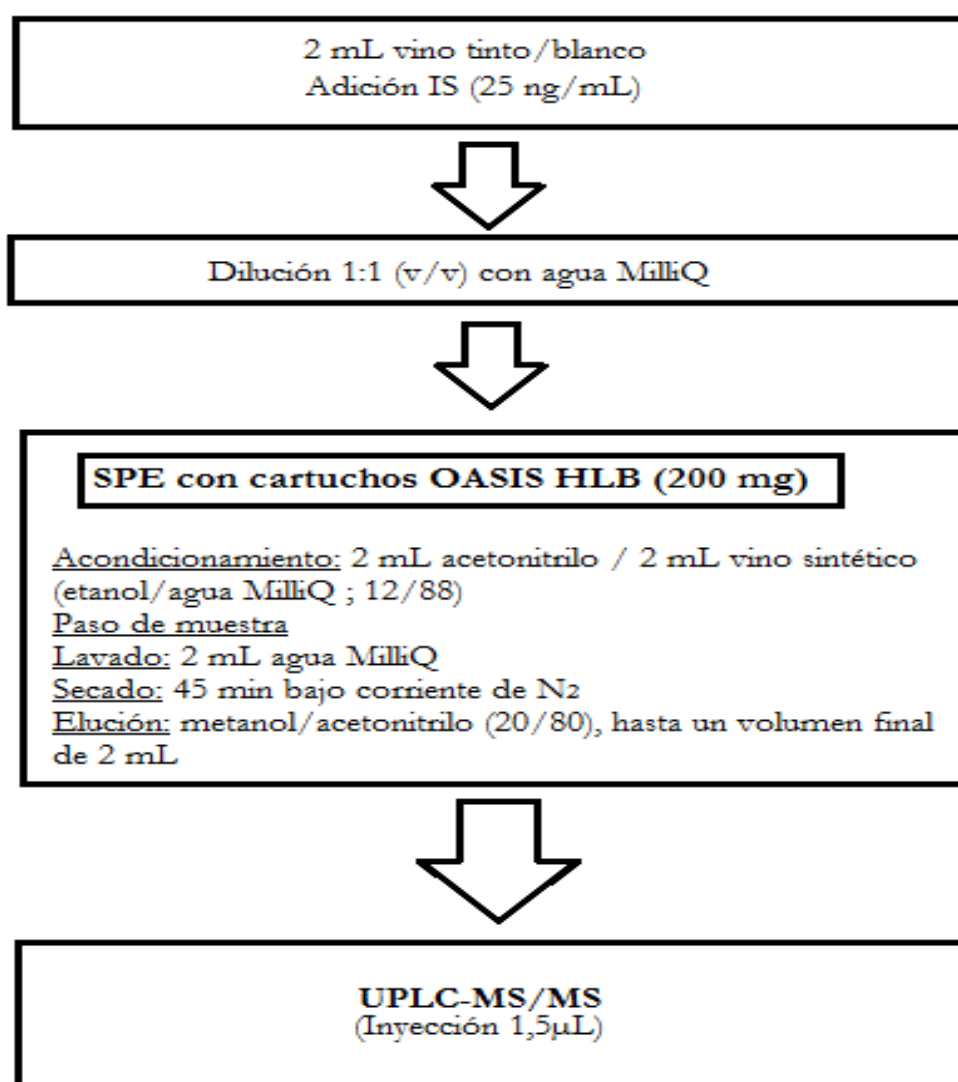


Figura IV.5. Condiciones optimizadas para la extracción de pesticidas en vino.

4. CARACTERIZACIÓN DEL MÉTODO DE DETERMINACIÓN.

Con las condiciones de extracción y determinación citadas anteriormente, se llevaron a cabo pruebas de recuperaciones absolutas de los compuestos a nivel de adición de 5 y 20 ng/mL sobre las muestras. Para cada muestra y nivel de adición se realizaron tres réplicas de las muestras con adición y los blancos, alícuotas de las mismas muestras sin adición, se procesaron en duplicado. Los IS se añadieron a nivel de 25 ng/mL y cada uno se utiliza para corregir unos determinados compuestos: CAR-d3 se emplea para CAR y TBZ; el CYP-d5 para CYP y PYM; el IMID-d4 para IMI y TME; y el MET¹³C₆ para el resto de compuestos. Los resultados para vino blanco comprenden, en el nivel de concentración 5 ng/mL, el rango entre 79-122%, y, en el nivel de concentración 20 ng/mL, el rango entre 84-109%. Por otro lado, en el caso del vino tinto, las recuperaciones se encuentran, para el nivel de concentración 5 ng/mL, en el rango 67-112% y, para el nivel de concentración 20 ng/mL, entre el rango 73-132 %. Los resultados obtenidos en las pruebas con vino blanco y vino tinto, se muestran en la **Tabla IV.6**. Los resultados son satisfactorios ya que la mayoría de los compuestos se ajustan en todos los casos al rango de recuperación entre 70-120 %. Para la realización de estas pruebas se ha eliminado de los resultados el compuesto THI-M, debido a que las concentraciones utilizadas se encuentran en el límite o por debajo del LOQ en los experimentos con muestras adicionadas a 5 ng/mL.

Para calcular las recuperaciones (%R) se recurrió a la siguiente ecuación:

$$\%R = \frac{C_m - C_b}{C_p} \times 100.$$

Donde C_m, C_b y C_p son la concentración medida de analito en el extracto de la muestra con adición, en el extracto de la muestra sin adición (o blanco) y en el patrón añadido respectivamente.

Tabla IV.6. Recuperaciones (%R) para vino tinto y vino blanco evaluadas para dos niveles de concentración: 5 y 20 ng/mL

Compuesto	Vino tinto				Vino Blanco			
	%R	CV (%)	%R	CV (%)	%R	CV (%)	%R	CV (%)
	5 ng/mL		20 ng/mL		5 ng/mL		20 ng/mL	
AME	97	3	105	6	104	9	96	5
BEN	88	11	105	3	101	1	98	4
BOS	91	13	110	2	88	13	97	3

Compuesto	Vino tinto				Vino blanco			
	%R	CV (%)	%R	CV (%)	%R	CV (%)	%R	CV (%)
	5 ng/mL		20 ng/mL		5 ng/mL		20 ng/mL	
CAR	99	6	99	3	122	3	109	1
CYP	91	2	111	1	101	4	100	6
DIM	112	3	110	9	102	24	99	11
FEH	91	4	108	0	102	20	95	2
FEP	89	8	102	7	94	5	84	1
FLU	95	10	104	4	109	5	100	8
IMI	73	11	115	9	80	13	100	2
IPR	84	13	99	3	111	3	99	4
MAN	88	22	112	8	112	3	99	4
MET	99	3	106	5	106	3	98	2
MYC	84	9	106	13	88	17	86	3
PEN	84	9	102	5	84	8	90	5
PYC	96	6	105	4	100	2	95	4
PYM	90	12	112	14	106	4	97	1
TEC	89	8	101	6	98	12	94	1
TEF	93	10	102	5	107	2	97	3
TBZ	94	17	115	8	79	5	106	2
TME	67	2	101	7	84	18	90	11
THI-M	n.e	-	74	7	n.e.	-	89	24
TRI	88	12	97	6	102	6	92	2

n.e. : No evaluado. El nivel de adición es inferior al LOQ del método para este compuesto.

Para estudiar la reproducibilidad del método analítico global (correspondientes a los datos de preparación de muestra y determinación), es decir, la concordancia de varias medidas realizadas en días diferentes, se procedió a la extracción en las condiciones óptimas tanto de vino blanco como tinto. Las extracciones y determinaciones se realizaron durante tres días consecutivos realizando tres réplicas por vino y por día, con un nivel de adición en muestra de 10 ng/mL, un blanco de muestra cada día. En la **Tabla. IV.7.** se muestran los resultados, como recuperaciones (%R) en condiciones de reproducibilidad, obtenidos para ambos tipos de vino, dando valores entre 64-116 % para muestras de vino blanco y valores situados entre 68-108 % para muestras de vino tinto, con la excepción del TME para el que se ha obtenido un valor no aceptable en cuanto a la exactitud medida en condiciones de reproducibilidad. A la vista de los resultados obtenidos con estas pruebas, se considera necesario el empleo de IS adicionales para la mejora en la exactitud del método para algunos compuestos, por ejemplo el TME.

Tabla IV.7. Recuperaciones en condiciones de reproducibilidad (%R \pm SD) para vino blanco y tinto.

Compuesto	Vino tinto		Vino blanco	
	%R 10 ng/mL	CV (%)	%R 10 ng/mL	CV (%)
AME	90	5	101	13
BEN	96	5	102	7
BOS	97	6	100	8
CAR	97	3	94	5
CYP	103	3	105	12
DIM	104	7	106	8
FEH	90	16	83	15
FEP	91	5	90	4
FLU	103	7	102	6
IMI	99	14	101	14
IPR	91	5	100	13
MAN	108	5	108	13
MET	101	5	101	5
MYC	105	16	102	14
PEN	96	11	92	10
PYC	99	12	97	12
PYM	102	4	116	8
TEC	99	9	97	16
TEF	99	8	105	11
TBZ	68	4	84	5
TME	47	13	64	10
THI-M	107	11	104	16
TRI	95	14	103	4

En la **Tabla IV.8.** se muestran los límites de cuantificación (LOQs) del método del método de SPE-UPLC-ESI-MS/MS obtenidos para los diferentes pesticidas. Los valores obtenidos son idénticos a los LOQs instrumentales, excepto en el caso de aquellos compuestos para los que se observaron fuertes efectos de matriz (**Tabla IV.5.**). En estos casos (CAR, TBZ, IMI y TME) los LOQs del método se incrementan según la atenuación de señal observada.

Tabla IV.8. Límites de cuantificación, LOQs (ng/mL), del método obtenidos para cada compuesto.

Compuesto	LOQ (ng/mL)	Compuesto	LOQ (ng/mL)
AME	0,4	MET	0,1
BEN	0,1	MYC	0,4
BOS	0,2	PEN	0,2
CAR	0,3	PYC	0,2
CYP	0,2	PYM	0,1
DIM	0,7	TEC	0,5
FEH	0,5	TEF	0,1
FEP	0,1	TBZ	0,4
FLU	0,2	TME	0,2
IMI	0,6	THI-M	10
IPR	0,1	TRI	0,7
MAN	0,1		

5. APLICACIÓN A MUESTRAS DE VINO COMERCIALES.

Una vez optimizadas las condiciones del método y estudiadas las características del método desarrollado, se aplicó a la determinación de los compuestos de interés estudiados en muestras de vino blanco y vino tinto comerciales producidos en diferentes países. En la **Tabla IV.9.** se muestra el país de origen de cada muestra comercial, identificadas con un código alfanumérico, y año de producción.

Tabla IV.9. Código asignado para los diferentes vinos comerciales, blancos y tintos, analizados. Indicando el país de origen y año de producción.

Código	Denominación de origen	Año de producción
• <u>Vinos Blancos:</u>		
W1	Alemania	2014
W2	España	2012
W3	España	2016
W4	Portugal	Desconocido
W5	Francia	2015
W6	Francia	2015
W7	España	2016
• <u>Vinos Tintos:</u>		
R1	España	2015
R2	Sudáfrica	2015
R3	Chile	2015
R4	Francia	2015
R5	China	Desconocido
R6	España	2016
R7	Australia	2014
R8	Francia	2013
R9	Francia	2015

A continuación, en la **Tabla IV.10.** y la **Tabla IV.11.** se recogen los resultados obtenidos en el análisis de las muestras comerciales. Los datos obtenidos corresponden en todos los casos al uso de patrones de calibración como técnica de cuantificación.

Tabla IV.10. Concentración (ng/mL), encontradas en las diferentes muestras de vino blanco comercial, analizadas mediante SPE-UPLC-MS/MS, n=2 réplicas y al final el sumatorio de las concentraciones encontradas.

Compuesto	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7
AME	0,4	n.d.	n.d.	n.d.	4,1	n.d.	n.d.
BEN	n.d.	n.d.	1,4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BOS	8,4	10,2	52,0	5,4	19,7	n.d.	n.d.
CAR	n.d.	11,5	5,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
CYP	0,8	5,9	11,2	n.d.	n.d.	2,6	n.d.

Compuesto	W1	W2	W3	W4	W5	W6	W7
DIM	1,4	8,4	40,0	0,9	3,2	5,0	n.d.
FEH	8,5	80,9	63,9	1,5	18,7	n.d.	n.d.
FLU	1,1	0,5	9,2	n.d.	7,7	3,2	n.d.
IMI	n.d.	13,6	8,8	2,9	n.d.	n.d.	6,9
IPR	3,0	74,9	114,4	1,4	n.d.	n.d.	n.d.
MAN	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	3,0	n.d.
MET	0,4	27,3	49,4	6,3	n.d.	n.d.	1,72
MYC	0,9	n.d.	3,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PYM	1,5	46,9	58,4	0,8	2,4	3,5	n.d.
TEC	1,1	n.d.	5,8	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
TRI	n.d.	6,7	6,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ concentración (ng/mL)	27,4	286,8	435,8	19,2	55,8	17,3	8,62

n.d.: no detectado

Tabla IV.11. Concentración (ng/mL), encontradas en las diferentes muestras de vino tinto comercial, analizadas mediante SPE-UPLC-MS/MS, n= 2 réplicas y al final el sumatorio de las concentraciones encontradas.

Compuesto	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9
AME	n.d.	n.d.	n.d.	3,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,6
BEN	n.d.	n.d.	n.d.	0,7	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BOS	n.d.	5,5	2,1	19,6	n.d.	n.d.	n.d.	7,3	2,1
CAR	n.d.	n.d.	0,4	1,7	24,9	2,0	n.d.	n.d.	n.d.
CYP	3,4	0,8	0,2	2,2	n.d.	13,6	n.d.	8,5	n.d.
DIM	n.d.	3,3	n.d.	5,2	23,3	4,6	n.d.	6,1	2,3
FEH	n.d.	n.d.	n.d.	107,0	n.d.	1,0	n.d.	130,7	1,4
FLU	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IPR	1,6	n.d.	n.d.	1,7	n.d.	2,2	n.d.	n.d.	n.d.
MAN	n.d.	n.d.	n.d.	1,7	n.d.	n.d.	n.d.	2,0	n.d.
MET	12,6	n.d.	n.d.	1,4	5,5	31,3	3,0	4,4	3,9
MYC	n.d.	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	3,2	n.d.	n.d.	n.d.
PYM	1,9	n.d.	0,3	18,5	4,9	28,1	n.d.	2,4	n.d.
TEC	2,5	0,6	3,9	2,9	n.d.	n.d.	n.d.	2,1	2,0
TEF	n.d.	0,1	1,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Σ concentración (ng/mL)	22,0	4,8	8,1	168,1	58,6	86,0	3,0	163,5	13,3

n.d.: no detectado.

En los resultados de los análisis, podemos observar que en ninguna de las muestras comerciales de vino blanco aparecieron los siguientes compuestos: FEP, PEN, PYC, TEF, TBZ, THI-M, y TME; y en los vinos tintos comerciales, no aparece a ninguna concentración: FEP, IMI, PEN, PYC, TBZ, TME, THI-M y TRI. No se detectaron para dichas muestras de vino a niveles superiores a los LOQs del método propuesto.

Cuando se detecta un compuesto positivo, se compara el pico cromatográfico del compuesto con el de un patrón, verificando la coincidencia del tiempo de retención (máxima diferencia 0,1 min) y la relación entre transiciones (máxima diferencia 30 %). En la **Figura IV.6.** y la **Figura IV.7.** se muestran los cromatogramas para el compuesto CYP, obtenido en condiciones óptimas para la muestra de vino blanco W6 y en un patrón de 5 ng/mL, respectivamente. En este caso el intervalo de tolerancia para la relación de intensidad entre transiciones es $IP2/IP1=0,61\pm0,18$.

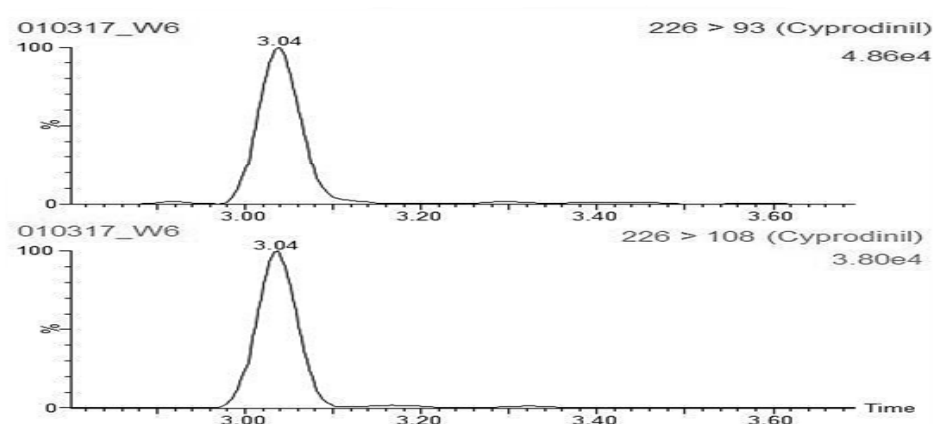


Figura IV.6. Cromatograma correspondiente a las dos transiciones para el CYP en la muestra W6 (2,6 ng/mL). Transición superior 226>93 (cuantificación) y transición inferior 226>108 (cualificación). Relación de intensidades $IP2/IP1=0,66$.

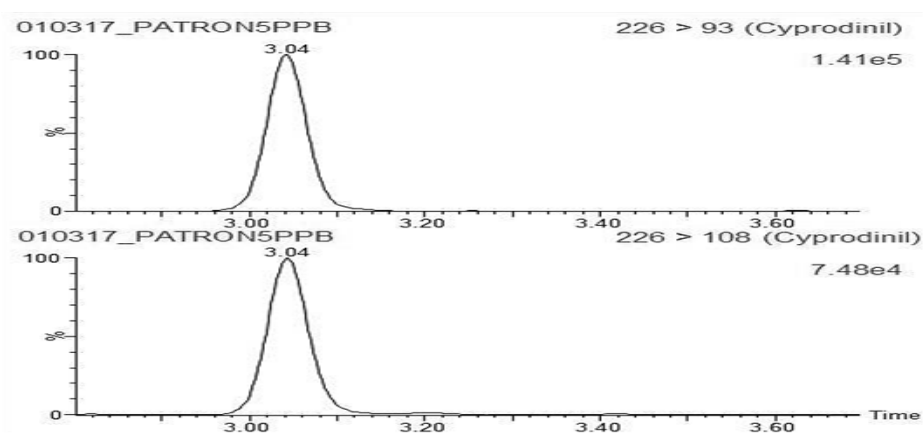


Figura IV.7. Cromatograma correspondiente a las dos transiciones para el CYP en un patrón de 5 ng/mL. Transición superior 226>93 (cuantificación) y transición inferior 226>108 (cualificación). Relación de intensidades $IP2/IP1=0,61\pm0,18$.

Otro ejemplo de compuesto positivo, en abundantes muestras comerciales de estudio, es el Metalaxyl, positivo con una concentración de 0,4 ng/mL en el vino con referencia W1 (**Figura IV.8**) y positivo con una concentración de 31,3 ng/mL en el vino con referencia R6 (**Figura IV.9**). Ambas se comparan con el cromatograma de un patrón de Metalaxyl de 1 ng/mL (**Figura IV.10**). El grado de concordancia en los tiempos de retención y la relación de intensidades entre transiciones es satisfactorio.

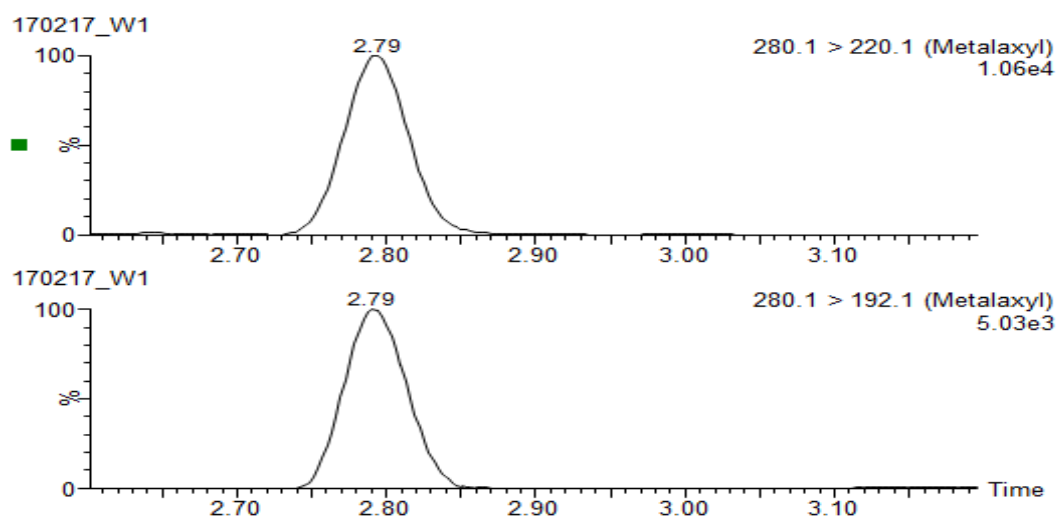


Figura IV.8. Cromatograma correspondiente a las dos transiciones para el MET' en la muestra W1 (0,4 ng/mL). Transición superior 280.1>220.1 (cuantificación) y transición inferior 280.1>192.1 (cualificación). Relación de intensidades $IP2/IP1=0,56$

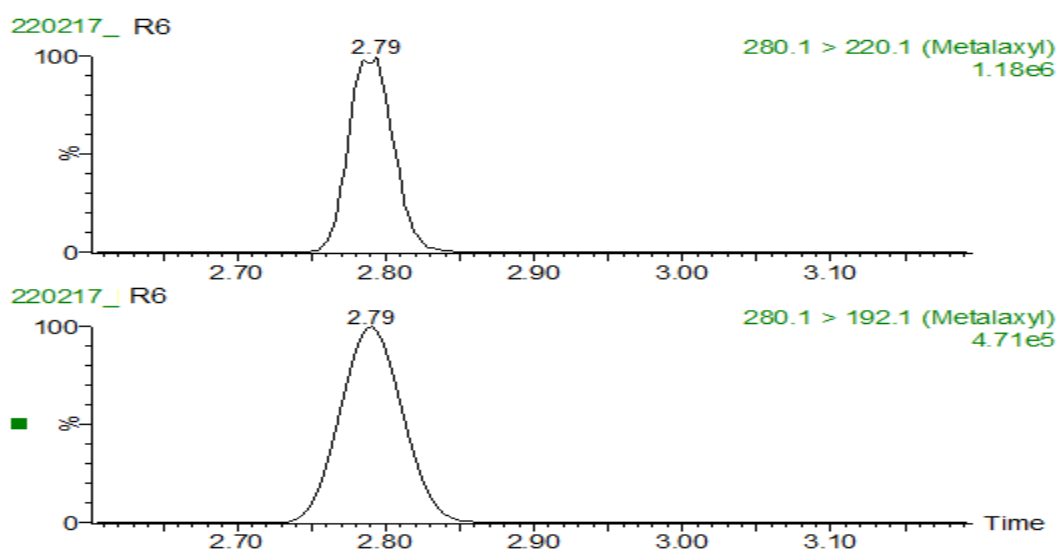


Figura IV.9. Cromatograma correspondiente a las dos transiciones para el MET' en la muestra R6 (31,3 ng/mL). Transición superior 280.1>220.1 (cuantificación) y transición inferior 280.1>192.1 (cualificación). Relación de intensidades $IP2/IP1=0,56$.

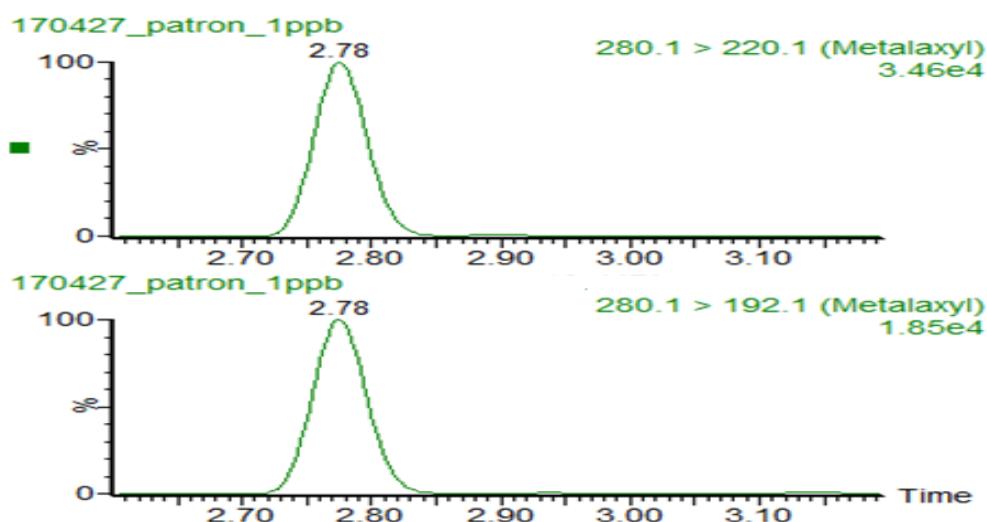


Figura IV.10. Cromatograma correspondiente a las dos transiciones para el MET en un patrón de 1 ng/mL. Transición superior 280.1>220.1 (cuantificación) y transición inferior 280.1>192.1 (cualificación). Relación de intensidades $IP2/IP1=0,57\pm0,17$

Es de destacar que aunque se detectaron bastantes pesticidas en las diferentes muestras de vino comerciales, pero, en ningún caso superaron el 10 % de los LMRs permitidos en uvas, tal y como se recomienda, ya que todavía no existen LMRs para vino en la legislación vigente. No obstante, el nivel total de concentración (sumatorio de concentraciones, **Tabla IV.10.** y **Tabla VI.11.**) es significativo para varias muestras tanto de vinos blancos (W2 y W3) como tintos (R4 y R8)

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado un método para la cuantificación de pesticidas, concretamente veinte fungicidas y tres insecticidas, en vino blanco y tinto. En la etapa de preparación de muestra se optimizó la extracción en fase sólida (SPE) utilizando cartuchos OASIS HLB (200 mg), compuestos por divinilbenceno-N-vinilpirrolidona (DVB-VP), como adsorbente. Como técnica de determinación se utilizó cromatografía de líquidos con una interfase de electroespray acoplada a espectrometría de masas (UPLC-ESI-MS/MS).

Las conclusiones generales obtenidas a partir de los resultados de este proyecto relativo a la determinación de fitosanitarios en vino, son:

- ❖ Ante los problemas de retención que presentan los cartuchos OASIS MAX (150 mg) para algunos compuestos, los cartuchos OASIS HLB (200 mg), junto con la combinación metanol:acetonitrilo (20:80) como disolvente de elución, son elegidos como mejor opción en la extracción en fase sólida de pesticidas en muestras con matrices complejas, como es el caso del vino. Así, se consigue la retención selectiva de componentes de la matriz y proporciona extractos con menor porcentaje de interferencias.
- ❖ El método estudiado y optimizado se puede aplicar tanto a vinos blancos como a vinos tintos procesados a partir de distintas variedades de uvas.
- ❖ Los límites de cuantificación (LOQs) del estudio se sitúan la mayoría por debajo de 1,0 ng/mL, excepto en el caso de THI-M que asciende al valor de 20 ng/mL. El rango de respuesta lineal abarca hasta 200 ng/mL, y el tiempo de análisis ha sido de solo 10 minutos por muestra.
- ❖ En todas las muestras de vino (blancos y tintos) comerciales analizadas se han detectado la presencia de varios pesticidas, sin embargo todas las concentraciones encontradas se encuentran por debajo del 10% de los LMRs fijados en uvas, tal y como recomienda la legislación, por lo que no se considera preocupante.

CAPÍTULO V. CONCLUSIONES

Neste traballo estudouse un método para a cuantificación de pesticidas, en particular, vinte funxicidas e tres insecticidas, en viño branco e máis tinto. No paso da preparación da mostra, optimizouse a extracción en fase sólida (SPE) empregando cartuchos OASIS HLB (200 mg), compostos por divinilbenceno-N-pirrolidona (DVB-VP), como adsorbente. Para a técnica de determinación utilizouse cromatografía de líquidos con unha interfase de electrospray acoplada a espectrometría de masas (UPLC-ESI-MS/MS).

As conclusións xerais a obtidas a partir dos resultados deste proxecto relativo á determinación de pesticidas en viño, son:

- ❖ Ante os problemas de retención que mostraban os cartuchos OASIS MAX (150 mg) para algún compostos, os cartuchos OASIS HLB (200 mg), en conxunto coa mistura metanol:acetonitrilo (20:80) como disolvente de elución, son elixidos como mellor opción na extracción en fase sólida de pesticidas en mostras con matrices complexas, como é o caso do viño. Así é conseguida a retención selectiva de componentes da matriz e proporciona extractos con menos porcentaxe de interferencias.
- ❖ O método estudado e optimizado pódese aplicar tanto a viños brancos coma tintos procesados a partir de diferentes variedades de uvas.
- ❖ Os límites de cuantificación do estudo (LOQs) son máis baixos de 1,0 ng/mL agás no caso do THI-M que ascende ao valor de 20 ng/mL. O rango de resposta lineal cobre ata 200 ng/mL e o tempo de análise foi de só 10 minutos por mostra.
- ❖ En todas as mostras de viño (brancos e tintos) comercial analizadas detectouse a presenza de varios pesticidas, máis, porén, todas as concentracións atopadas son inferiores ao 10% dos LMR fixados en uvas, tal e como recomenda a lexislación, polo que non se considera preocupante.

CHAPTER V. CONCLUSIONS

In this work, we have studied a method for the quantification of pesticides, specifically twenty fungicides and three insecticides, in white and red wine. In the sample preparation step, the solid phase extraction was optimized using cartridges OASIS HLB (200 mg), containing divinylbenzene-N-vinylpyrrolidone (DVB-VP) as adsorbent. As determination technique, ultraperformance liquid chromatography was used with an electrospray interface coupled to mass spectrometry (UPLC-ESI-MS7MS).

The general conclusions drawn from the results of this project concerning the determination of pesticides in wine are:

- ❖ Due to the retention problems presented by the OASIS MAX sorbent (150 mg) for some compounds of this project, the cartridges OASIS HLB (200 mg), together with the methanol:acetonitrile (20:80) mixture, are chosen as the best option in the solid phase extraction of pesticides in samples with complex matrices, as is the case with the wine.
- ❖ The method studied and optimized can be applied to both, white and red wines, obtained from different varieties of grapes.
- ❖ The limits of quantification (LOQs) were below 1,0 ng/mL for most of the compounds, except in the case of THI-M with a LOQ of to 10 ng/mL. The linear response range covers up to 200 ng/mL, and the analysis time was only 10 minutes per sample.
- ❖ In all commercial wine samples (white and red) analyzed, the presence of several pesticides was conformed, however all the concentrations obtained are below 10% of the Maximum residue levels(MRLs) fixed in grapes, as recommended by legislation.

VI. BIBLIOGRAFÍA.

- [1] Ministerio de agricultura y pesca, alimentación y medio ambiente.: [mhttp://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/fitosanitarios/](http://www.mapama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/productos-quimicos/fitosanitarios/) (Acceso el día: 11/05/2017)
- [2] <http://www.cricyt.edu.ar/enciclopedia/terminos/ProducFito.htm> (Acceso el día: 11/05/2017)
- [3] WERNER BALTES. “Química de los alimentos”. Editorial Acribia, S.A., 2007. Capítulo 11 “Residuos en los alimentos”, páginas: 206-217
- [4] R.Labrada, J.C.Caseley, C.Parker. “ESTUDIO FAO PRODUCCIÓN Y PROTECCIÓN VEGETAL 120” Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, 1996. ISSN 1014- Capítulo 10: Herbicidas. <http://www.fao.org/docrep/T1147S/t1147s00.htm#Contents> (Acceso el día: 12/05/2017)
- [5] Taberner Palou, Andreu; Cirujeda Ranzenberger, Alicia; Zaragoza Larios, Carlos. “Manejo de poblaciones de malezas resistentes a herbicidas”. (FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 100 preguntas sobre resistencia. PDF sacado de: <http://www.fao.org/3/a-a1422s.pdf> (Acceso el día: 12/05/2017)
- [6] BISSET, Juan A. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 2002, vol. 54, no 3, p. 202-219.
- [7] DEVINE, Gregor J.; EZA, Dominique; Ogusuku, Elena; FURLONG, Michael J. Uso de insecticidas: contexto y consecuencias ecológicas. *Revista peruana de medicina experimental y Salud Pública*, 2008, vol. 25, no 1, p. 74-100.
- [8] Ministerio de agricultura y ganadería. (protección agropecuaria; servicio de diagnóstico fitosanitario) de costa Rica <http://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/H20-5054.pdf> (Acceso el día: 11/05/2017)
- [9] GEPP, V.; MONDINO, P. Control químico. 2011. PDF obtenido de: <http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/docs/cursos/fitopato/Materiales/Guías/C-QUIMICO.pdf> (Acceso el día: 7/7/2017)
- [10] ROSSLENBROICH, Hans-Juergen; STUEBLER, Dietrich. Botrytis cinerea—history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 2000, vol. 19, no 8, p. 557-561.
- [11] Figura 1.1 : <http://www.vitivinicultura.net/botritis-o-podredumbre-gris-botrytis-cinerea-pers.html> (Acceso el día: 12/05/2017)
- [12] CAMPBELL, Paul; BENDEK, Carlos; LATORRE, Bernardo A. Riesgo de oídio (Erysiphe necator) de la vid en relación con el desarrollo de los racimos. *Ciencia e investigación agraria*, 2007, vol. 34, no 1, p. 5-11.
- [13] “Cómo combatir el oídio de la vid”; Jose Javier Pérez de Obanos Castillo. PDF sacado de: <https://www.navarra.es/NR/rdonlyres/05E65D9B-D1A2-4EAD-9A63-AFF1D3215552/135109/Comocombatireloididelavid.pdf> (Acceso el día: 12/05/2017)
- [14] Imagen 1.2. sacadas las 3 de <http://www.vitivinicultura.net/oidio-de-la-vid.html> (Acceso el día: 12/05/2017)
- [15] BARRIOS, Gonçal; REYES, Joan. Modelización del Mildiu de la Vid. 2004. http://www.ruralcat.net/migracio_resources/617683_mildius.PDF (Acceso el día: 12/05/2017)
- [16] Imágenes sacadas de <http://www.vitivinicultura.net/mildiu-de-la-vid-enfermedades-vina.html> (Acceso el día: 13/05/2017)
- [17] HUQ, Mainul; MEISNER, Craig; DASGUPTA, Susmita. Health effects and pesticide perception as determinants of pesticide use: evidence from Bangladesh. <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US2012411738> (Acceso el día: 13/05/2017)

- [18] BADI, Mohammad H.; LANDEROS, Jerónimo. Plaguicidas que afectan a la salud humana y la sustentabilidad. *CULCYT*, 2015, no 19. Revista vista en <http://openjournal.uacj.mx/ojs/index.php/culcyt/article/view/454> (Acceso el día: 7/7/2017)
- [19] OLEA, Nicolás; FERNÁNDEZ, Mariana F. Plaguicidas persistentes. En *Congreso Implementación del Convenio de Contaminantes Orgánicos Persistentes. Madrid*. 2001. p. 26-27.
- [20] <http://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/about-codex/es/> (Acceso el día: 14/05/2017)
- [21] http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels_en (Acceso el día: 14/05/2017)
- [22] ORDÓÑEZ, Juan A.; Cambero Rodríguez, M.I.; Fernández Álvarez, L.; García Sanz, M.L.; García de Fernando Minguillón, G.D.; de la Hoz Perales, L.; Selgas Cortecero, M.D.. Tecnología de los alimentos. Volumen 1. Componentes de los Alimentos y Procesos. *Síntesis. Madrid*, 1998.págs: 349-351
- [23] CELA, Rafael; Casais, Maria del Carmen; Lorenzo, Rosa Antonia. *Técnicas de separación en química analítica*. Síntesis, 2002. Capítulo 11: Extracción y lixiviación por disolvente (págs.:206-260)
- [24] CANTWELL, Frederick F; LOSIER, Manon. Liquid—liquid extraction. *Comprehensive Analytical Chemistry*, 2002, vol. 37, p. 297-340.
- [25] Imagen de LLE sacada de : <http://procesosbio.wikispaces.com/Extracci%C3%B3n+liquido-liquido> (Acceso el día: 15/05/2017)
- [26] HENNION, Marie-Claire. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1999, vol. 856, no 1, p. 3-54.
- [27] CELA, Rafael; Casais, Maria del Carmen; Lorenzo, Rosa Antonia. *Técnicas de separación en química analítica*. Síntesis, 2002. Capítulo 16: Técnicas de adsorción y absorción en la preparación de muestras. Extracción y microextracción en fase sólida. (págs.520-555)
- [28] Imagen spe sacada: <http://toxicob.blogspot.com.es/2013/10/las-intoxicaciones-con-farmacos.html> (Acceso el día: 15/05/2017)
- [29] Cháfer Pericás, Consuelo. "Acoplamiento microextracción en fase sólida-cromatografía." (2006). <http://roderic.uv.es/handle/10550/14940> (Acceso el día: 16/05/2017)
- [30] Imagen SPME http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-53832002000100005 (Acceso el día: 16/05/2017)
- [31] MONTES GOYANES, Rosa María. "Avances en técnicas de microextracción para la determinación de compuestos traza en muestras medioambientales y alimentarias." Tesis doctoral, Noviembre 2009. (Págs.: 34-55)
- [32] LEHOTAY, Steven J.; Ae Son, Kyung; Kwon,Hyeyoung; Koesukwiwat, Uairat; Fu, Wusheng; Mastovska, Katerina; Hoh, Eunha; Leepipatpiboon, Natchanun. Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no 16, p. 2548-2560.
- [33] Imagen QuEChERS https://www.researchgate.net/publication/279221361_QuEChERS_A_Sample_Preparation_for_Extraction_of_Carbaryl_from_Rat_Feces (Acceso el día: 16/05/2017)
- [34] STASHENKO, Elena E.; MARTÍNEZ, Jairo René. Preparación de la muestra: un paso crucial para el análisis por GC-MS. *Uma publicação trimestral do Instituto Internacional de Cromatografia (IIC) Ciência Cromatográfica*, 2011, vol. 3, no 1.
- [35] Imagen GC-MS <https://orgspectroscopyint.blogspot.com.es/2014/11/gas-chromatography-mass-spectrometry-gc.html> (Acceso el día: 17/05/2017)
- [36] <http://www.actlabs.com/page.aspx?menu=65&app=221&cat1=534&tp=2&lk=no> (Acceso el día: 17/05/2017)

- [37] Quintela, O., Cruz, A., Concheiro, M., De Castro, A., & López-Rivadulla, M. (2005). Metodología LC-MS. Aspectos generales de la técnica y sus aplicaciones en el campo de la toxicología. *Rev Toxicol*, 22, págs.7-14.
- [38] Imagen LC-MS
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/en/f/f9/Liquid_chromatography_tandem_Mass_spectrometry_diagram.png (visto: 18/05/2017)
- [39] Vargas de la Cruz, Celia Bertha. "Adaptación de la Metodología Analítica para la determinación de residuos de plaguicidas en frutas nativas de exportación mediante Uplc-Ms/Ms." (2012). Tesis obtenida en: <http://200.62.146.130/handle/cybertesis/2331> (Acceso el día: 7/7/2017)
- [40] ROMERO GONZÁLEZ, Roberto; Fernández Moreno, José Luis; Plaza Bolaños, Patricia; Garrido Frenich, Antonia; Martínez Vidal, José Luis. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. *Revista Española de salud pública*, 2007, vol. 81, no 5, p. 461-474.
- [41] PAYÁ, Andrus. Fundamento y Funciones de la Espectrometría de Masas. *Universidad de Valencia, España*, 2006. <http://mural.uv.es/calcan/> (Acceso el día: 19/05/2017)
- [42] Imagen MS sacada de : <https://es.slideshare.net/MaYaTorrez/espectrometria-demajas> (Acceso el día: 21/05/2017)
- [43] ECONOMOU, Anastasios; Botitsi, Helen; Antoniou, Spyros; Tsiipi, Despina. Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2009, vol. 1216, no 31, p. 5856-5867.
- [44] FONTANA, A. R., Rodríguez, I.; Ramil, M.; Altamirano, J.C.; Cela, R. Liquid chromatography time-of-flight mass spectrometry following sorptive microextraction for the determination of fungicide residues in wine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 2011, vol. 401, no 2, p. 767-775
- [45] PELAJIĆ, Maja, G Peček, DM Pavlović, DV Čepo. Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography-mass spectrometry and solid phase extraction. *Food chemistry*, 2016, vol. 200, p. 98-106
- [46] Ignaz J. Buerge, Jürgen Krauss, Rocío López-Cabeza, Werner Siegfried, Michael Stüssi, Felix E. Wettstein, Thomas Poiger. Stereoselective Metabolism of the Sterol Biosynthesis Inhibitor Fungicides Fenpropidin, Fenpropimorph, and Spiroxamine in Grapes, Sugar Beets, and Wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, vol. 64, no 26, p. 5301-5309
- [47] M Hu, X Liu, F Dong, J Xu, S Li, H Xu, Y Zheng. Determination of ametoctradin residue in fruits and vegetables by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method using ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Food chemistry*, 2015, vol. 175, p. 395-400
- [48] WALORCZYK, Stanislaw; DROŹDŹYŃSKI, Dariusz; GNUSOWSKI, Boguslaw. Multiresidue determination of 160 pesticides in wines employing mixed-mode dispersive-solid phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2011, vol. 85, no 4, p. 1856-1870
- [49] Tianyang Guo, Pingping Fang, Juanjuan Jiang, Feng Zhan, Wei Yong, Jiahui Liu, YiYang Dong. Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red wine by direct analysis in real time mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2016, vol. 1471, p. 27-3
- [50] GONZÁLEZ-RODRÍGUEZ, R. M.; CANCHO-GRANDE, B.; SIMAL-GÁNDARA, J. Decay of fungicide residues during vinification of white grapes harvested after the application of some new active substances against downy mildew. *Food chemistry*, 2011, vol. 125, no 2, p. 549-560.
- [51] CARPINTEIRO, I., Ramil, M., Rodríguez, I., Cela, R. Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2010, vol. 1217, no 48, p. 7484-7492.